



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Fitotecnia

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN COLECCIONES
DE AMARANTO EMPLEANDO RAPD E ISSR**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

DANIEL ALFREDO LEAL ALVARADO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

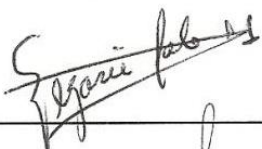
CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, 12 DE ENERO DEL 2012

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN COLECCIONES DE AMARANTO EMPLEANDO RAPD E ISSR

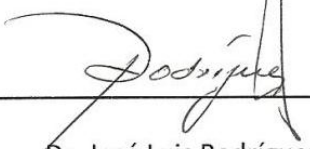
Tesis realizada por el Ing. Daniel Alfredo Leal Alvarado, bajo la dirección del comité asesor indicado; aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

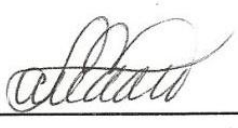
DIRECTOR: _____


Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR: _____


Dr. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR: _____


Dr. Jaime Sahagún Castellanos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por la oportunidad concedida para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

Al Departamento de Fitotecnia por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por dirigir el trabajo de tesis, por todo su apoyo y por los conocimientos aportados.

A mis maestros por su disposición y ayuda brindadas.

A mis amigos y compañeros por su ayuda y continuo aliento.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten.

A mis Padres por su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos por sus consejos y continuo aliento.

CON TODO MI AFECTO

DANIEL LEAL ALVARADO.

ÍNDICE

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Origen y distribución del género <i>Amaranthus</i>	4
2.2. Taxonomía y descripción botánica	5
2.2.1 Taxonomía	5
2.2.2 Descripción botánica	7
2.3. Efectos del ambiente en el amaranto	9
2.4. Características de algunas especies del género <i>Amaranthus</i>	10
2.4.1 <i>A. hypochondriacus</i> (<i>A. leucocarpus</i>)	10
2.4.2 <i>A. caudatus</i> (<i>A. edulis</i>)	11
2.4.3 <i>A. cruentus</i>	11
2.4.4 Otras especies	12
2.5. Relaciones filogenéticas en el amaranto	12
2.6. Tipos de marcadores moleculares	13
2.6.1 Antecedentes	13
2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
2.6.3 Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)	17
2.6.4 Intermicrosatélites o Intersecuencias Simples Repetidas (ISSRs)	18
2.7. Estudios realizados con marcadores moleculares en amaranto	19

	Pág.
3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Material vegetal	21
3.2. Protocolo de extracción de ADN	22
3.3. Concentración y calidad de ADN	24
3.4. Condiciones de la PCR	24
3.5. Elaboración de geles	28
3.6. Análisis estadístico de la información	29
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Caracterización de razas de amaranto	31
4.1.1. Análisis de escalonado multidimensional	34
4.1.2. Construcción de dendrogramas	37
4.1.3. Re-muestreo	41
4.1.4. Análisis de Mantel	45
4.2. Resultados del análisis de poblaciones	48
5 CONCLUSIONES	56
6 BIBLIOGRAFÍA	57
7 ANEXOS	62
7.5 Glosario.	68

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Características de los genotipos de <i>Amaranthus</i> evaluados en la caracterización de especies y razas de amaranto.	21
2. Características de los genotipos de <i>Amaranthus</i> evaluados en el análisis de poblaciones.	22
3. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para la caracterización de especies y razas de amaranto.	27
4. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para el análisis de las poblaciones.	28
5. Número de bandas obtenidas por iniciador en la caracterización de especies y razas de amaranto.	33
6. Valores de similitud genética de re-muestreo de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso (RAPD + ISSR).	43
7. Valores de correlación obtenidos con la prueba de Mantel.	47
8. Número de bandas obtenidas por iniciador en el análisis de las poblaciones.	51
9. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para 15 poblaciones de amaranto.	53
10. Variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de amaranto, con base a los patrones RAPD y ISSR.	54
Anexos:	
7.2. Matriz de RAPD para la caracterización de especies y razas de amaranto.	64
7.3. Matriz de ISSR para la caracterización de especies y razas de amaranto.	65
7.4. Matriz de Consenso (RAPD + ISSR) para la caracterización de especies y razas de amaranto.	66

Índice de figuras

	Pág.
1. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de RAPD en el termociclador Techne TC-512.	25
2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne TC-512.	26
3. Gel de calidad de ADN para la caracterización de especies y razas de amaranto.	31
4. Patrones de bandeo de los genotipos de <i>Amaranthus</i> evaluados. A. Patrones RAPD obtenidos con el iniciador A02. B. Patrones ISSR obtenidos con el iniciador P1.	32
5. Distribución de grupos de los genotipos de <i>Amaranthus</i> . A. RAPD. B. ISSR. C. RAPD+ISSR.	35
6. Gráficas en 3D mostrando la distribución de grupos de los genotipos de <i>Amaranthus</i> . A. RAPD. B. ISSR. C. RAPD+ISSR.	36
7. Dendrogramas de relaciones entre 14 genotipos de <i>Amaranthus</i> , obtenidos con datos de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso "RAPD + ISSR".	40
8. Dendrogramas de relaciones entre genotipos de <i>Amaranthus</i> , obtenidos utilizando datos de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso (RAPD + ISSR), con 1000 re-muestreos.	42
9. Correlación entre marcadores: A. RAPD vs ISSR; B. RAPD vs Consenso y C. ISSR vs Consenso.	46
10. Gel de calidad de ADN para análisis de las poblaciones.	48
11. Patrones de bandeo RAPD de los genotipos de <i>Amaranthus</i> evaluados con el iniciador A02, para el análisis de poblaciones.	49
12. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de <i>Amaranthus</i> evaluados con el iniciador P1, para análisis de poblaciones.	50
Anexos:	
7.1. Características de las semillas de razas de amaranto.	62

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN COLECCIONES DE AMARANTO EMPLEANDO RAPD E ISSR

Daniel Alfredo Leal Alvarado¹ y Juan Porfirio Legaria Solano²

¹Estudiante tesista de la Maestría en Biotecnología Agrícola. ²Director de tesis. Posgrado de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

RESÚMEN

Con el objetivo de conocer la variabilidad genética existente en colecciones de amaranto (*Amaranthus spp*); así como determinar relaciones de parentesco entre diferentes especies y razas, se evaluaron 14 genotipos de amaranto. Para la caracterización se utilizaron 7 iniciadores RAPD y 10 ISSR. Los patrones de bandas obtenidos se analizaron por separado y en conjunto formando un consenso (RADP + ISSR). De este análisis se concluyó que los marcadores ISSR son mejores discriminantes que los RAPD para la formación de agrupamientos de las especies, corroborando que los *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* están más relacionados entre sí, mientras que *A. cruentus* se encuentra más alejado de las otras 2 especies. Para el análisis de poblaciones se utilizaron 15 genotipos, analizados con 6 iniciadores RAPD y 6 iniciadores ISSR y se concluyo que los materiales con mayor variación genética intra-poblacion fueron *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80 seguido de los materiales *A. caudatus* 'Sudamericana' 91, *A. hypochondriacus* 'Nepal' 58 y *A. caudatus* 'Sudamericana' 27.

Palabras clave: Amaranto, caracterización, RAPD, ISSR, análisis de poblaciones.

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY IN COLLECTIONS OF AMARANTH USING RAPD AND ISSR

Daniel Alfredo Leal Alvarado¹ y Juan Porfirio Legaria Solano²

¹Estudiante tesista de la Maestría en Biotecnología Agrícola. ²Director de tesis. Posgrado de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

ABSTRACT

With the objective of assessing the genetic variability in amaranth collections (*Amaranthus* spp); as well as to determine relationship relationships among different species and races, 14 amaranth genotypes were studied. For the characterization 7 initiators RAPD and 10 ISSR were used. The patterns of bands were analyzed separately and forming a consensus (RADP + ISSR). It was concluded that the ISSR markers a better discrimination that RAPD markers in the formation of clusters of the species, and that the *A. hypochondriacus* and *A. caudatus* are more related with each other, while *A. cruentus* is more distant from these 2 species. For the analysis of populations, 15 genotypes were analyzed with 6 RAPD and 6 ISSR primers. It was found that the materials that showed larger genetic variability within the population was *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80, followed by *A. caudatus* 'South American' 91, *A. hypochondriacus* 'Nepal' 58, and *A. caudatus* 'South American' 27.

Words key: Amaranth, characterization, RAPD, ISSR, populations' analysis.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Amaranthus* incluye aproximadamente 60 especies, algunas de ellas han sido cultivadas por más de 5,000 años para cosechar sus granos o utilizar sus partes vegetativas; entre las que se encuentran *A. caudatus*, *A. cruentus*, y *A. hypochondriacus* (Kauffman, 1986). *A. hypochondriacus* se cultiva desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el centro de México, y traslapa con la localización de *A. cruentus* que se extiende del Norte de México hasta Centroamérica. *A. caudatus* se encuentra principalmente en la región de los Andes en Sudamérica (Sauer, 1976).

Las tres especies se consideran autopolinizables, con polinización cruzada de 3 a 25 % según la variedad y el ambiente (Jain *et al.*, 1982). También las tres son diploides con $2n = 2x = 32$ cromosomas, aunque hay reportes de $2n = 34$ en *A. cruentus* (Sauer, 1976).

Los amarantos pertenecen al grupo de plantas "C4", una modalidad fotosintética de alta eficiencia en el aprovechamiento de la radiación solar y del dióxido de carbono presente en la atmósfera, que es poco habitual en plantas de la clase de las dicotiledóneas (Chagaray, 2005).

En *Amaranthus* se han realizado algunos estudios de tipo agronómico y de caracterización morfológica (Carballo y Ramirez, 2006). Las evaluaciones

agronómicas y nutricionales se han basado en el estudio de caracteres como el vigor de la planta, la precocidad, la producción media, la aptitud al enraizamiento, la susceptibilidad a ciertas enfermedades y plagas y otras. Para caracterizar las diferencias genéticas entre cultivares mediante criterios agronómicos, se requiere un número elevado de repeticiones en espacio y en tiempo ya que se trata de caracteres muy influenciados por las condiciones ambientales (Rallo *et al.*, 2005).

El empleo de los marcadores genéticos moleculares ha permitido caracterizar la diversidad genética de especies vegetales debido a que presentan una buena constancia o repetibilidad y no interaccionan con el ambiente. Además, los marcadores moleculares no muestran dependencia tejido-específica o de diferentes estadios de desarrollo de la planta y con ello se ha evitado la pérdida de tiempo útil para el estudio y caracterización de especies ya que al estudiar y caracterizar por medio de las características morfológicas o agronómicas conlleva a esperar todo el ciclo biológico de la planta.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo analizar la diversidad genética presente entre y dentro de poblaciones de *Amaranthus* spp., utilizando marcadores tipo RAPD (polimorfismos en el ADN amplificados al azar) e ISSR (inter-microsatélites).

1.2. Objetivos generales

Conocer la variabilidad genética existente en colecciones de amaranto (*Amaranthus spp*); así como determinar relaciones de parentesco entre diferentes razas y especies de Amaranto.

1.3. Objetivos específicos

Evaluar la diversidad genética presente en poblaciones de amaranto *Amaranthus spp.*, utilizando marcadores tipo RAPD e ISSR.

Analizar la diversidad genética dentro y entre las colecciones y comparar identidades genotípicas de dos o más colecciones de amaranto.

1.4. Hipótesis

Ho: El análisis molecular de diversas accesiones de amaranto permitirá caracterizar y relacionar con base en sus diferencias y similitudes genómicas, también proveer así información básica que sugiera la posible ubicación taxonómica de los materiales estudiados.

Ha: El análisis molecular de diversas accesiones de amaranto, no permitirá caracterizar ni relacionar con base en sus diferencias y similitudes genómicas, ni proveerá información básica que sugiera la posible ubicación taxonómica de los materiales estudiados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución del género *Amaranthus*

La palabra amaranto significa inmarcesible es decir que no se marchita; y proviene del griego 'Amarantón', de *a*= sin y *marainein* = marchitar, palidecer.

La evidencia arqueológica sugiere que amarantos de grano han sido cultivados en México desde hace 5,000 años. Del *Amaranthus cruentus* se descubrieron semillas en el Valle de Tehuacán, Puebla, México y es datado aproximadamente hace 4,000 años, sin embargo el cultivo no es nativo de esta región, es probable que fuera introducido después de ser cultivado en otra parte (Sauer, 1976).

El *A. hypochondriacus* es originario de México posiblemente derivado de poblaciones silvestres de *A. powelli*, mientras que el *A. cruentus* es originario de América Central tal vez generado de poblaciones de *A. hybridus*; mientras que *A. caudatus* es originario de la región Andina en América del Sur posiblemente de poblaciones de *A. quitensis*.

En la América precolombina se cultivaron tres especies para la producción de grano: *A. caudatus* en los Andes, *A. cruentus* en América central y *A. hypochondriacus* en México (Sauer, 1950; 1967). A estos lugares se les considera

como centros de distribución ya que con la llegada de los españoles al continente americano se difundió hacia el viejo mundo.

2.2. Taxonomía y descripción botánica

2.2.1 Taxonomía

Reino	Vegetal
División	Fanerógama
Tipo	Embryophyta siphonogama
Subtipo	Angiosperma
Clase	Dicotiledoneae
Subclase	Archyclamidae
Orden	Centrospermales
Familia	Amaranthaceae
Género	<i>Amaranthus</i>
Sección	<i>Amaranthus</i>
Especies	<i>caudatus, cruentus e hypochondriacus</i>

La familia amaranthaceae está conformada de 60 géneros y alrededor de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical que se adaptan bien a climas templados (Feine *et al.*, 1979).

Los principales centros de distribución son los trópicos de América y la India, aun cuando en los trópicos de África y Australia existe un importante número de especies (Sauer, 1967).

La familia del amaranto ha evolucionado en regiones cálidas y secas con suelos salinos, lo que da como resultado adaptaciones anatómicas y fisiológicas especiales, como la presencia de tricomas globuliformes en las hojas que actúan como estructuras de secreción externa para eliminar las sales que se presentan en exceso en el suelo, cutícula gruesa, en algunas especies presencia de espinas y fijación del carbono atmosférico por la vía C4 (Sauer, 1967; Fiene *et al.*, 1979).

En la sección *Amaranthus* se incluyen las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. edulis*; son plantas con flores pentámeras e inflorescencia terminal de crecimiento indeterminado (excepto *A. edulis*) que se utilizan para producción de grano. Se incluyen también la mayoría de los ornamentales, muchos de los tipos para verdura y varios de los que se consideran malezas (Grubben y van Sloten, 1981).

Dentro del grupo para producción de grano se incluye a *A. hybridus*, el cual se está utilizando en el mejoramiento de características agronómicas como precocidad y altura (Kauffman, 1981).

La sección *Blitopsis* incluye especies para verdura como *A. tricolor* y *A. blitum* L. (Grubben y van Sloten, 1981).

El género *Amaranthus* es un grupo taxonómicamente difícil. Ha existido mucha confusión en la nomenclatura y clasificación de estas plantas debido a su gran semejanza y amplia distribución geográfica.

Los nombres que diferentes autores les han dado a estas plantas son muy variados. Sin embargo, después de varios estudios se ha llegado a la conclusión de que las especies de semillas comestibles se reducen a: *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus* (National Research Council, 1984).

La clasificación que se está utilizando en la actualidad es la que describen Kauffman y Reider (1984), donde los tipos 'Azteca', 'Nepal', 'Mercado', 'Mixteco' y 'Picos' pertenecen a *A. hypochondriacus*; los tipos 'Mexicano', 'Africano' y 'Guatemalteco' pertenecen a *A. cruentus*; el tipo 'Prima' pertenece a *A. hybridus*; mientras que el 'Sudamericano' y 'Edulis' entran en *A. caudatus*. Los tipos 'Azteca' y 'Mixteco' fueron sugeridos para clasificar los amarantos de la especie *A. hypochondriacus* con origen en el D.F., Estado de México, Tlaxcala y Puebla (tipo 'Azteca') y los del Estado de Oaxaca (tipo 'Mixteco'), de acuerdo con las civilizaciones que florecieron en estos lugares en la época precolombina.

2.2.2. Descripción botánica

El género *Amaranthus* comprende hierbas anuales procumbentes erectas, con hojas simples, alternas, enteras y largamente pecioladas.

Plantas generalmente matizadas con un pigmento rojizo llamado amarantina, algunas formas cultivadas son intensamente coloreadas. El color se manifiesta desde las primeras etapas de crecimiento de las plántulas, poco después de la germinación.

Las unidades básicas de la inflorescencia son los llamados glomérulos; cada uno consiste en una flor estaminada inicial y un número indefinido de flores femeninas. Los glomérulos están agrupados en un eje sin hoja para formar complejas inflorescencias llamadas técnicamente tirsos, los cuales son denominados comúnmente espigas, panojas o “mazorcas”.

El eje principal de la inflorescencia es inusualmente ramificado. La longitud y número de esas ramas, con su ángulo y el eje principal, determinan la forma de la inflorescencia.

Flores unisexuales, en plantas monoicas o dioicas, en densos racimos cimosos situados en las axilas de las hojas y en algunas especies en tirsos terminales densos, sin hojas. Cada dicasio lleva una bráctea persistente de punta espinosa; sépalos libres 3-5 y estambres 3-5, en flores estaminadas; 0-5 en flores pistiladas, ramificaciones del estilo 3, plumosas. La parte femenina forma un utrículo circunsesil simple e indehisciente. Semilla lenticular blanca o café oscura, con el embrión enrollado alrededor de un endospermo amiláceo (Chagaray, 2005).

2.3. Efectos del ambiente en el amaranto

El amaranto ha sido cultivado desde ambientes tropicales hasta tierras semiáridas, y desde el nivel del mar hasta algunas de las zonas agrícolas de mayor altitud en el mundo; sin embargo tradicionalmente su cultivo se ubica dentro de los 30° de latitud (National Research Council, 1984).

Muchos amarantos son sensibles a la longitud del día; así *A. hypochondriacus* requiere de días cortos para poder alcanzar la madurez, en tanto que *A. cruentus*, forma muy rápido las semillas cuando se coloca en condiciones de días muy largos, mientras que *A. caudatus* es reconocido como especie de días cortos, ya que usualmente florece y forma semillas únicamente cuando la longitud del día es menor a ocho horas.

El amaranto crece satisfactoriamente desde el nivel del mar hasta los 3200 m de altitud, pero únicamente *A. caudatus* prospera en altitudes sobre 2500 msnm. En general, el amaranto crece mejor cuando la temperatura en forma cotidiana es de al menos 21 °C, aunque *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* toleran altas temperaturas pero no resisten el frío, siendo *A. caudatus* mas tolerante al frío que otras especies (National Research Council, 1984).

El cultivo del amaranto prospera en lugares cálidos con temperaturas de 29 °C y en localidades templadas con temperaturas medias anuales de 14 °C, con precipitaciones de 400 hasta 1300 mm anuales (INEGI, 1998). Los inviernos definidos con heladas tempranas afectan principalmente al follaje, pero poco al

grano. La temperatura óptima para la germinación es de 16 a 35 °C, su crecimiento cesa a los 8 °C y a los 4 °C se daña el cultivo (National Research Council, 1984).

2.4. Características de algunas especies del género *Amaranthus*

2.4.1. *A. hypochondriacus* (*A. leucocarpus*)

Domesticado en México, posiblemente de poblaciones silvestres de *A. powelli*, se cultiva esporádicamente en México y Guatemala, más intensamente en India y Nepal; se utiliza como grano de sopas y tamales y para la elaboración de dulces.

A. hypochondriacus es una planta herbácea anual de 1.5 a 2 m de altura, tallo ramificado desde la base y marcado con estrías longitudinales, hojas largamente pecioladas y ovadas que miden aproximadamente 15 cm de largo y 10 cm de ancho, inflorescencias en panículas terminales o axilares muy ramificadas de aproximadamente 50 cm de largo.

Flores en panículas terminales o axilares hasta 50 cm de largo, muy ramificadas, con numerosas flores rojas o púrpura de 4 a 5 mm, masculinas unas y femeninas otras. El fruto es una cápsula pequeña que se abre transversalmente y contiene una sola semilla blanca, lisa y brillante, ligeramente aplanada y del tamaño de un grano de mostaza. En la Cuenca de México se cultivan dos variedades de esta especie: la morada y la blanca. La primera presenta espigas color rojo o púrpura y

el borde de las hojas algo rosado, la blanca tiene espigas de color verde claro y hojas de color uniforme.

Según Feine *et al.* (1979), las semillas de amaranto son pequeñas, ovaladas blancas, lisas, brillantes y ligeramente aplanadas. Su peso varía entre 0.06 a 0.09 gramos por 100 semillas.

2.4.2. *A. caudatus* (*A. edulis*)

Originaria de los Andes, del Ecuador y del noreste de Argentina y, como la especie anterior cultivada por sus granos en Asia. Se caracteriza por las inflorescencias, por lo común pendientes, hasta de un metro de largo, formadas por numerosas ramas cilíndricas y una terminal, o en ciertos tipos por ramas cortas casi esféricas o en forma de maza; existen variedades de granos negros y blancos.

2.4.3. *A. cruentus*

Es cultivado como grano en las tierras altas de México y Guatemala. Las ramas de la inflorescencia no son simples como en las especies de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* sino que emiten ramillas secundarias hacia la base y el ápice. Por esta apariencia de plumas de la inflorescencia, y por sus colores brillantes, esta especie se cultiva comúnmente como ornamental.

2.4.4. Otras especies

***Amaranthus tricolor (A. gangeticus)*:** Del Oeste de Asia, es una hierba que alcanza hasta 1.5 m de altura en 40 o 60 días y produce follaje abundante. Una variedad, “Tampala”, es posiblemente la más productiva de la familia.

***Amaranthus lividus (A. blitum)*:** Es también cultivada ampliamente, sobre todo la variedad “Oleoracea” en China, Sureste de Asia y África Occidental.

***Amaranthus dubius*:** Se cultiva principalmente en África occidental. Es posible que de esa región su uso se extendiera a las Antillas y América Central, donde es cultivado por los descendientes de los africanos. Es uno de los “calalúes”, hierbas de diferentes especies que se cocinan mezcladas.

***Amaranthus hybridus*:** Es otra hierba de cultivo amplio y esporádico; en México se le conoce como “quintonil”. Estas especies de *Amaranthus* se consumen no solo de plantas cultivadas sino que también se recogen de plantas silvestres.

***Celosía argentea*:** Es otra amarantácea que se cultivada ampliamente, de consumo popular en África occidental.

2.5. Relaciones filogenéticas en el amaranto

Las tres especies son diploides con $2n = 2X = 32$ cromosomas, aunque hay reportes de $2n = 34$ en *A. cruentus* (Sauer, 1976).

Hay claras incompatibilidades genéticas entre las tres especies. Gupta y Gudu (1991) analizaron la viabilidad y fertilidad de todos los híbridos F1 posibles entre las tres principales especies cultivadas: Las cruzas entre *A. caudatus* y *A. cruentus* rindieron un número pequeño de semillas F1 las cuales murieron a las cuatro semanas después de la germinación, Las cruzas entre *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* también rindieron muy pocas semillas F1, la mayoría murieron como plántulas y las que sobrevivieron hasta la madurez (cuatro plantas) fueron estériles. Los híbridos F1 entre *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* resultaron más exitosos porque pudieron madurar y ser auto-polinizados para producir generaciones F2 y F3, aunque presentaron polen con baja fertilidad (10.3 a 15.1 %). Tales síntomas de incompatibilidad subrayan la necesidad de realizar una identificación fiel al nivel de especies para poder realizar mejoramiento genético y conservar los recursos genéticos de amaranto.

2.6. Tipos de marcadores moleculares

2.6.1. Antecedentes

Claros (1998) menciona que el mejoramiento genético se ha realizado desde la prehistoria, toda vez que se han seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas, basándose principalmente en el fenotipo, esto gracias a la variabilidad genética y a la heredabilidad de caracteres morfológicos, lo cual requiere de observaciones exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo.

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas (morfológicas) que los distinguen entre sí. Esta variabilidad o “polimorfismos” genéticos, ocurren en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre 2 individuos sirve entonces como una etiqueta o “marcador genético” que se convertirá en un rasgo característico propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos. Estos son los marcadores morfológicos y los moleculares (Valadez - Kahl, 2000).

Sin embargo, antes de los moleculares una segunda generación de marcadores genéticos son los marcadores “bioquímicos”. Estos pueden ser representados por los metabolitos secundarios, proteínas estructurales, isoenzimas o enzimas (Valadez - Kahl, 2000).

Las isoenzimas son moléculas de proteínas con cargas eléctricas diferentes y que pueden separarse utilizando procedimientos de electroforesis usualmente mediante geles de almidón (Staub *et al.*, 1996). Tanto los marcadores morfológicos como los bioquímicos pueden ser específicos de un tejido en particular o de un estadio de la planta. Aunque hay muchos casos en que han tenido éxito los marcadores morfológicos y bioquímicos; los dos, sin embargo, presentan desventajas como lo son las atribuibles a la interacción con el ambiente (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

Los marcadores moleculares se basan en las variaciones al nivel del ADN. Estos no son afectados por el ambiente al depender de las propiedades del ADN, las cuales no cambian aunque las plantas estén sujetas a condiciones variadas y extremas (Valadez - Kahl, 2000).

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80's han aportado esta clase nueva de llamados "marcadores genético-moleculares" que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Estas diferencias resultan de cambios o re-arreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Este tipo de marcadores detecta variaciones directas a nivel del ADN y tienen ventajas como el hecho de ser dominantes o codominantes, de desarrollarse de manera estable, de carecer de efectos pleiotrópicos y sobre todo de no estar sujetos a interacción con el ambiente (Claros, 1998).

Para obtener marcadores de ADN, se usan diferentes métodos que se pueden agrupar de manera convencional en tres categorías. La primera se basa en la técnica conocida como hibridación tipo "Southern". Esta técnica tiene el propósito de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos del ADN ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. En esta categoría se incluye a los RFLP y a los VNTR (Valadez - Kahl, 2000).

La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (polymerase chain reaction). Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables no mayores de 6 kb en promedio. Estas secuencias pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas. Para esta tecnología se pueden citar como ejemplos las metodologías RAPD, AP-PCR, DAF y AFLP (Valadez - Kahl, 2000).

La tercera categoría involucra metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern. Por ejemplo la técnica de RAHM o llamada también RAMPO, que requiere de la síntesis previa de ADN con cualquiera de las metodologías de la PCR y la posterior hibridación con alguna sonda que detecte microsatelites, optimizando de esta manera la tipificación del ensayo pues con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de “primera generación” pero al hibridar las huellas con una sonda radioactiva que detecta microsatelites se revela otro patrón llamado de “segunda generación”(Valadez - Kahl, 2000).

2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica de manera cíclica en una mezcla de reacción *in vitro*; lo anterior permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es

posible visualizar aún cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentración muy baja (Saiki *et al.*, 1988).

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con el ADN entre los dos oligonucleótidos y se sigue con un paso de amplificación. Luego, se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Claros, 1998).

Según la técnica, se usan uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN o diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Valadez - Kahl, 2000).

2.6.3. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

En RAPDs se utilizan iniciadores aleatorios, donde los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas, no involucra la transferencia tipo 'Southern' y son una herramienta para generar mapas genéticos y analizar relaciones taxonómicas (Valadez - Kahl, 2000).

Los marcadores RAPDs son generados por la amplificación mediante PCR de segmentos aleatorios de ADN genómicos con iniciadores sencillos usualmente de 10 nucleótidos de longitud, de secuencia arbitraria. Los iniciadores son utilizados como sustratos por parte de la Taq ADN polimerasa, para sintetizar y extender las secuencias genómicas a partir del extremo OH-3' de los iniciadores. La realización de este proceso, produce un discreto conjunto de productos de ADN amplificados que representan "blancos" de secuencias flanqueadas por los iniciadores orientados de forma opuesta y alineados en los sitios complementarios. Los productos amplificados pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida y visualizarse mediante tinción con bromuro de etidio o plata.

Los RAPDs son marcadores dominantes con polimorfismos entre individuos definidos como la presencia o ausencia de una banda particular.

2.6.4. Intermicrosatelites o Intersecuencias Simples Repetidas (ISSRs)

En la técnica de ISSRs se utilizan iniciadores cuya secuencia debe estar formada por di- o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El iniciador es complementario a una región microsatelite blanco, y el nucleótido extra permite la amplificación solamente si el 'primer' se pega a la terminación 5' del microsatelite con un primer nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora. Tales nucleótidos extras juegan el papel de "anclas" y aseguran que la amplificación inicie siempre del extremo 5' del microsatelite. En donde el cebador localiza dos regiones microsatelite separadas por una secuencia genómica

amplificable del ADN blanco, la reacción de PCR generará una banda de tamaño particular para ese “locus”, representando el fragmento de ADN que se encuentra entre los microsatelites (Bornet y Branchard, 2001).

Los ISSR permiten detectar alta variación y son muy reproducibles, dado esto último principalmente por las altas temperaturas de alineación utilizadas durante la PCR. Además, para diseñar los ‘primers’ no es necesario conocer secuencias del genoma del organismo en estudio, por lo que se han utilizado ampliamente en estudios de variación genética entre individuos muy cercanos y en la identificación de variantes con importancia agrícola (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Las bandas obtenidas son analizadas como marcadores dominantes, lo cual significa que cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante, mientras que la ausencia de la misma representa al genotipo recesivo.

2.7. Estudios realizados con marcadores moleculares en amaranto

Dehmer (2003) realizó un estudio sobre diversidad genética en *Amaranthus*. En él se evaluó 40 accesiones del banco genético IPK comprendiendo 13 especies utilizando marcadores AFLP. Se obtuvo un árbol genético mediante el análisis de un total de 893 bandas, separando las especies en los grupos correspondientes según la clasificación taxonómica imperante.

Wasson y Tranel (2005) publicaron un estudio de amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP) basados en relaciones de especies consideradas malezas o hierbas y especies de amaranto cultivadas.

Ranade *et al.* (1997) evaluaron amarantos para determinar variación Inter e intra-especies utilizando marcadores RAPD. Encontraron que *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* están genéticamente relacionados, mientras que estas dos especies están genéticamente alejadas de *A. hybridus*.

Mandal y Das (2002) también realizaron un estudio de diversidad genética intra- e inter-especies en *Amaranthus* usando RAPDs. Reportan que *A. cruentus* se encuentra genéticamente alejado de los *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*.

Legaria (2010) realizó el estudio intitulado 'Diversidad genética en algunas especies de Amaranto (*Amaranthus spp.*)' obteniendo como resultado que el *A. hypochondriacus* se relaciona más con *A. caudatus* y la especie más alejada fue *A. cruentus*, esta conclusión se obtuvo luego de evaluar 103 colecciones de *Amaranthus*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En el presente estudio 14 genotipos de amaranto fueron evaluados para la caracterización de especies y razas de amaranto (Cuadro 1, Anexo 7.1), mientras que para el análisis de poblaciones se incluyó un genotipo más, siendo estudiados 15 genotipos, integrando 5 individuos por genotipo, lo que sumó un total de 75 accesiones (Cuadro 2, Anexo 7.1).

Cuadro 1. Características de los genotipos de *Amaranthus* evaluados en la caracterización de especies y razas de amaranto.

Número de colecta	Especie	Raza	Color de grano
13	<i>hypochondriacus</i>	'Azteca'	Café-oscuro
35	<i>hypochondriacus</i>	'Azteca'	Blanco
16	<i>hypochondriacus</i>	'Mercado'	Blanco
21	<i>hypochondriacus</i>	'Mercado'	Café
68	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Blanco-negro
83	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Rosado
87	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Blanco
102	<i>hypochondriacus</i>	'Mixteco'	Cristalino
22	<i>cruentus</i>	'Mexicana'	Blanco
27	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Blanco-café
91	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Blanco
93, 97	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	cristalino
96	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Negro-blanco

Cuadro 2. Características de los genotipos de *Amaranthus* evaluados en el análisis de poblaciones.

Número de colecta	Especie	Raza	Color de grano
13	<i>hypochondriacus</i>	'Azteca'	Café-oscuro
35	<i>hypochondriacus</i>	'Azteca'	Blanco
16	<i>hypochondriacus</i>	'Mercado'	Blanco
21	<i>hypochondriacus</i>	'Mercado'	Café
68	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Blanco-negro
83	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Rosado
80, 87	<i>hypochondriacus</i>	'Nepal'	Blanco
102	<i>hypochondriacus</i>	'Mixteco'	Cristalino
22	<i>cruentus</i>	'Mexicana'	Blanco
27	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Blanco-café
91	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Blanco
93, 97	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	cristalino
96	<i>caudatus</i>	'Sudamericana'	Negro-blanco

3.2. Protocolo de Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo propuesto por De la Cruz *et al.* (1997), adaptado en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada en la Universidad Autónoma Chapingo.

Se maceraron 3 g de muestra fresca usando nitrógeno líquido en un mortero, dejando un polvo muy fino. Se transfirió el macerado con la ayuda de una espátula a un microtubo de 1.5 ml que contenía 600 µl de amortiguador de extracción, mezclando bien el amortiguador y el tejido pulverizado.

Se incubó por 10 min a una temperatura de 65 °C realizando una inversión ocasional a los tubos. Se adicionaron 200 µl de acetato de potasio a una

concentración 5M, se agitaron los tubos por inversión y se dejaron por 30 min a una temperatura de 4 °C. Se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a una velocidad de 15000 x g, luego se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 ml con 700 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a una temperatura de -20 °C.

Se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a una velocidad de 10000 x g, eliminando el sobrenadante y procediendo luego a disolver el precipitado en 200 µl de solución para diluir; luego de estar disuelto el precipitado se añadió 2 µl de ARNasa A y se dejó incubar por 1 hora a una temperatura de 37 °C.

Luego se adicionó 20 µl de acetato de sodio con una concentración 3M y 200 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó incubando por 2 horas a una temperatura de -20 °C.

Se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a una velocidad de 10000 x g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300 µl de etanol al 70 %, luego se dejó secar la pastilla y se disolvió en 100 µl de TE.

Las muestras se almacenaron a 4 °C para futuros análisis.

3.3. Concentración y Calidad de ADN

La concentración del ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Jenway 6305® UV/vis a 260 nm de absorbancia.

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). En cada uno de los pozos del gel, se colocó una mezcla compuesta de 3 µg de ADN y 1.5 µl de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xilen cianol, 30 % de Ficoll y 1 % de SDS).

El amortiguador de corrida utilizado fue TAE 10X (40mM tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na₂-EDTA), diluido a una proporción de 0.5X; la electroforesis se realizó a 80 voltios por un periodo de 2 h; transcurrido este tiempo el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 mg.mL⁻¹) Las imágenes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290. La calidad del ADN se definió como aceptable, al obtener una banda integra y uniforme por arriba de aproximadamente 12,000 pb, de cada una de las variedades evaluadas. Se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler).

3.4. Condiciones de la PCR

Mediante la técnica de PCR se sintetizaron fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar polimorfismos en el genoma de amaranto. Se utilizaron los programas siguientes de termociclador para RAPD e ISSR, respectivamente: para RAPD se utilizó el equipo Techne TC-512 y el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos (comprendiendo la

desnaturalización, alineamiento y extensión) de 30 s a 94 °C, 30 s a 38 °C, y 1.3 min a 72 °C, respectivamente; y al final 1 ciclo de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 1).

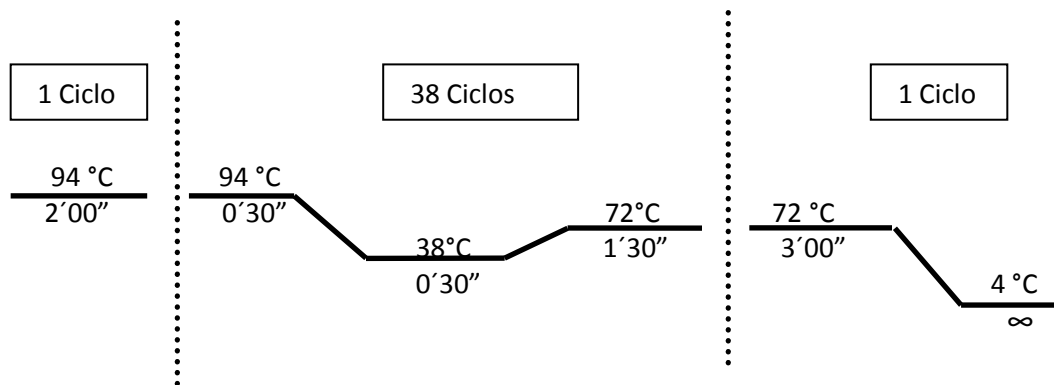


Figura 1. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de RAPD en el termociclador Techne TC-512.

Para obtener ISSR se utilizó también el equipo Techne TC-512 y el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos (comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión) de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, 1.3 min a 72 °C, respectivamente; y al final 1 ciclo de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 2).

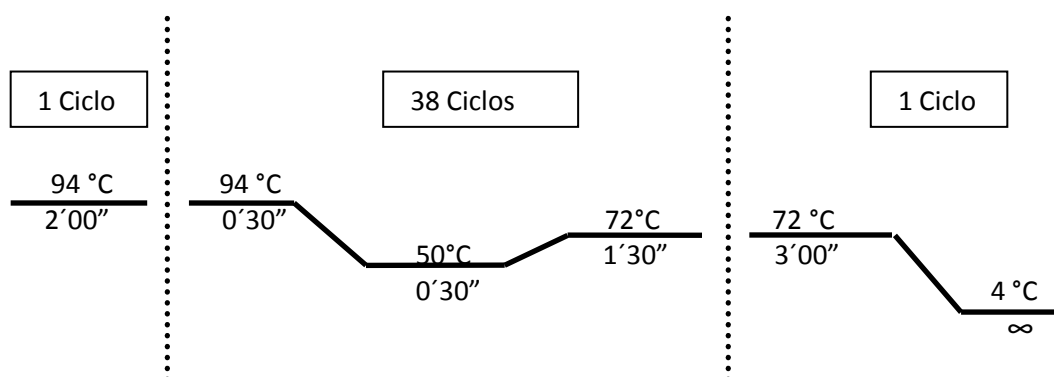


Figura 2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne TC-512.

Los componentes de reacción para el análisis de RAPD se colocaron en tubos Eppendorf de 200 µl conteniendo cada uno 25 µl de los siguientes componentes; 4 µl de ADN (10 ng/µl), 0.3 µl enzima Taq ADN polimerasa (5U.µL⁻¹), 10 µl de dNTPs (500 µM), 2.5 µl de amortiguador (10X), 2 µl de MgCl₂ (50 mM), 3 µl de iniciador y 3.2 µl de H₂O bidestilada.

Los componentes de reacción para el análisis tipo ISSR fueron los mismos que se utilizaron para RAPD solo que los iniciadores fueron los de ISSR.

Se utilizaron siete iniciadores para el caso de RAPD y 10 para ISSR (Cuadro 3) para la caracterización de especies y razas de amaranto mientras que para el estudio de poblaciones se utilizaron seis iniciadores para el caso de RAPD y seis para ISSR (Cuadro 4).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para la caracterización de especies y razas de amaranto.

Iniciadores	Secuencia
RAPD	
A02	5'-TGC CGA GCT G-3'
A09	5'-GGG TAA CGC C-3'
A20	5'-GTT GCG ATC C-3'
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'
B04	5'-GGA CTG GAG T-3'
B06	5'-TGC TCT GGC C-3'
B15	5'-GGA GGG TGT T-3'
ISSR	
A1	5'-ACACACACACACACT-3'
A2	5'-CCGCCGCCGCCGCCG-3'
A4	5'-CACACACACACACAAG-3'
A9	5'-CACACACACACACA-3'
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'
P1	5'-GAGCAACAACAACAA-3'
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAG-3'
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG-3'
P4	5'-ATGATGATGATGATG-3'
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'

Cuadro 4. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para el análisis de las poblaciones.

Iniciadores	Secuencia
RAPD	
A02	5'-TGC CGA GCT G-3'
A09	5'-GGG TAA CGC C-3'
A20	5'-GTT GCG ATC C-3'
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'
B06	5'-TGC TCT GGC C-3'
B15	5'-GGA GGG TGT T-3'
ISSR	
A9	5'-CACACACACACACA-3'
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'
P1	5'-GAGCAACAACAACAACA-3'
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG-3'
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'

3.5. Elaboración de geles

Los productos amplificados de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa con una concentración de 1.2 %. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 12.5 µl del producto de la reacción de PCR agregando 1 µl de amortiguador de carga. Como referencia se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler).

Los geles se corrieron a 120 voltios aproximadamente por 2 h en amortiguador TAE 0.5X y se tiñeron con bromuro de etidio.

Para la documentación de las huellas de ADN se utilizó el sistema Kodak High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290.

3.6. Análisis estadístico de la información

Se determinó el número de bandas o polimorfismos de cada genotipo que fueron visualizados en los geles de agarosa para cada iniciador; con estos datos se generó una matriz binaria 1 y 0; donde el 1 indicó la presencia de una banda de ADN particular en una muestra y el 0 representó la ausencia de dicha banda.

La matriz de los datos se vació en una hoja de cálculo (EXCEL) para su posterior utilización en el programa NTSYS versión 2.2 (Numerical Taxonomic Analysis System), calculando similitudes genéticas entre todas las muestras. Con este procedimiento se obtuvo una matriz de similitud aplicando el coeficiente de Jaccard.

En cuanto a la construcción de dendrogramas, éstos se elaboraron según el índice de similitud de Jaccard, tomando a cada accesión como una unidad taxonómica operacional (OTU).

Con la ayuda del programa FreeTree versión 0.9.1.50 se realizó 1000 remuestreos para obtener el árbol más robusto.

Para el análisis de poblaciones se usó el programa PopGen 32 (Yeh *et al.*, 1999) considerando como muestra a cinco individuos de cada población. En el análisis se estimaron parámetros como el porcentaje de *loci* polimórficos (p), número de alelos observados por locus (N_a) número efectivo de alelos por locus (N_e), índice de diversidad genética de Nei (H), índice de diversidad genética de Shannon (I), coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) y número de individuos migrantes (N_m).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.1. Caracterización de especies y razas de amaranto

El ADN de las accesiones a analizar obtenido durante la purificación fue de buena calidad como se muestra en la Figura 3, donde se observa una sola banda de alto peso molecular y bien definido en la parte superior del gel.

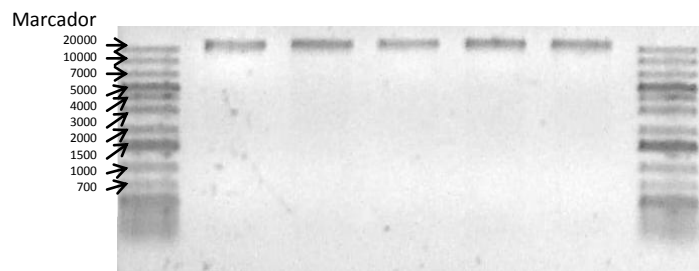


Figura 3. Gel de calidad de ADN para la caracterización de especies y razas de amaranto.

Se probaron 20 iniciadores RAPD y 10 ISSR de los que se seleccionaron los que se muestran en el Cuadro 3. Los iniciadores seleccionados para obtener los patrones RAPD e ISSR permitieron la amplificación de un buen número de bandas polimórficas, claras y nítidas entre razas y especies de amaranto. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos y los niveles de polimorfismo detectado.

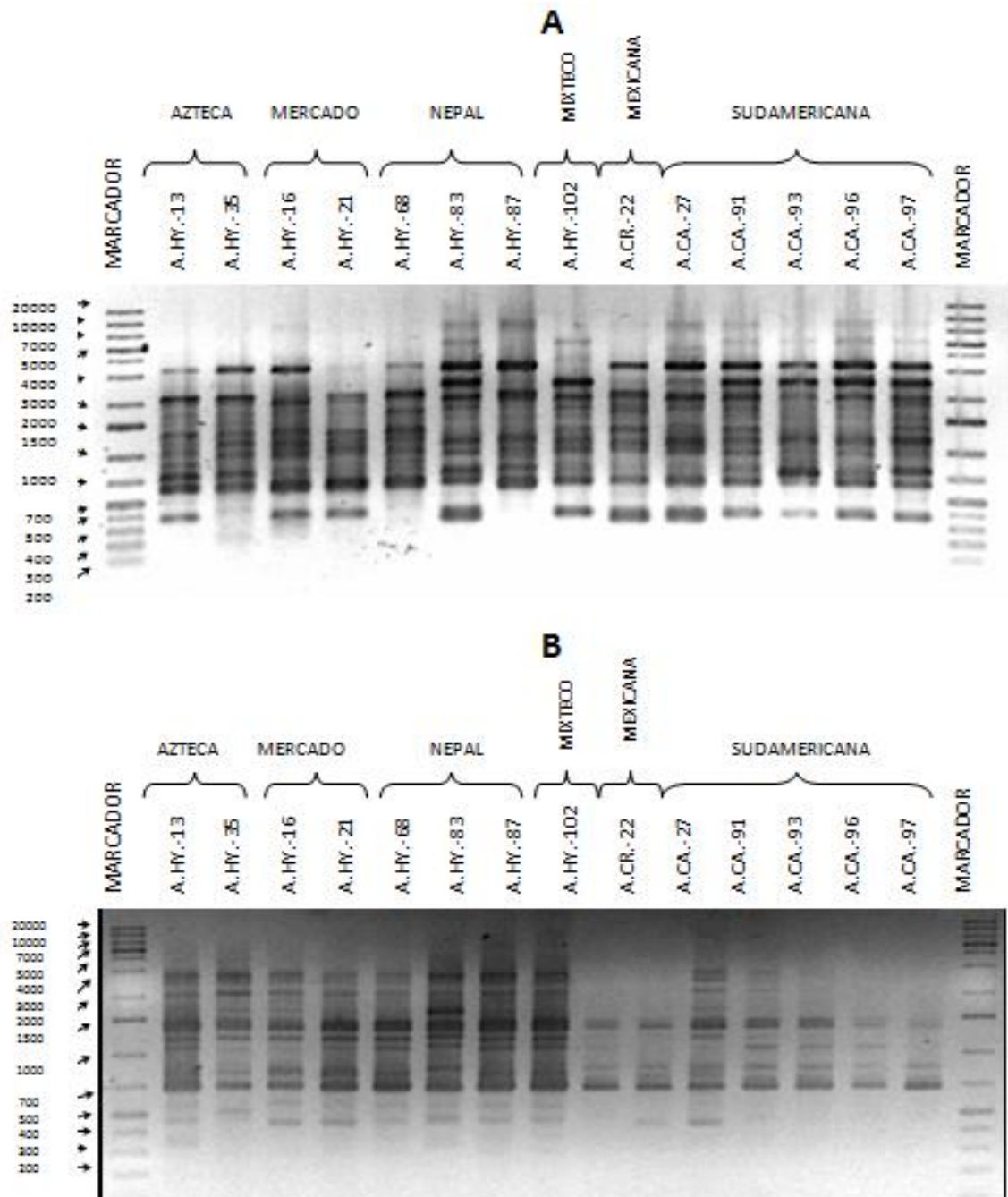


Figura 4. Patrones de bandeo de los genotipos de *Amaranthus* evaluados. A. Patrones RAPD obtenidos con el iniciador A02. B. Patrones ISSR obtenidos con el iniciador P1.

Los iniciadores que generaron mayor número de bandas fueron los ISSR presentando un total de 71 bandas con las cuales se elaboró una matriz básica de datos con 994 caracteres (Cuadro 5). En cambio los iniciadores RAPD amplificaron un total de 70 bandas lo que permitió la elaboración de una matriz básica de datos con 980 caracteres (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de bandas obtenidas por iniciador en la caracterización de especies y razas de amaranto.

Iniciadores	Secuencia	Núm. Total de	Núm. Total de bandas	% de polimorfismo
RAPD		Bandas	polimórficas	
A02	5'-TGC CGA GCT G-3'	12	9	75
A09	5'-GGG TAA CGC C-3'	10	5	50
A20	5'-GTT GCG ATC C-3'	9	8	89
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'	10	6	60
B04	5'-GGA CTG GAG T-3'	9	8	89
B06	5'-TGC TCT GGC C-3'	10	6	60
B15	5'-GGA GGG TGT T-3'	10	3	30
ISSR				
A1	5'-ACACACACACACACT-3'	7	6	86
A2	5'-CCGCCGCCGCCGCCG-3'	5	5	100
A4	5'-CACACACACACACAAG-3'	5	4	80
A9	5'-CACACACACACA-3'	3	3	100
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGA-3'	9	8	89
P1	5'-GAGCAACAACAACAA-3'	10	6	60
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAG-3'	8	6	75
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGTG-3'	8	7	88
P4	5'-ATGATGATGATGATG-3'	8	4	50
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAG-3'	8	5	63
Total de bandas		141	99	

El porcentaje de polimorfismo detectado con iniciadores RAPD varió de 30 a 89 %, con los iniciadores B15 y A20 y B04. Los iniciadores ISSR detectaron mayor polimorfismo, en un rango de 50 a 100 % (iniciadores P4 y A2 y A9). Esto demuestra que los marcadores ISSR se presentan mas discriminantes en relación a lo RAPD.

4.1.1. Análisis de escalonado multidimensional

Se realizó el análisis de escalonado multidimensional a los datos obtenidos tanto de la matriz RAPD (Anexo 7.2), matriz ISSR (Anexo 7.3) y matriz de consenso “RAPD + ISSR” (Anexo 7.4) con el propósito de identificar la distribución adecuada de los genotipos de los cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figuras 5 y 6; en 2 y 3 dimensiones, respectivamente.

En los gráficos de 2D y 3D que se obtuvieron con los datos de RAPD (Figura 5A y 6A) se observó la formación de 3 grupos, donde el grupo 1 se constituyó con las diferentes razas de la especie *A. hypochondriacus*, el grupo 2 estuvo conformado especialmente por la especie *A. caudatus* más dos accesiones de las razas de *A. hypochondriacus* ‘Mixteco’ y ‘Nepal’; mientras que el 3 se formó sólo con la especie *A. cruentus*.

En las figuras de 2D y 3D que se obtuvieron con los datos de ISSR (Figuras 5B y 6B) se observó la formación de tres grupos, que se constituyeron de la manera siguiente: un grupo se integró solo con las diferentes razas de *A.*

hypochondriacus; otro con *A. caudatus* y la accesión de una raza de *A. hypochondriacus* 'Mixteco' y el tercero se formó con los *A. cruentus*.

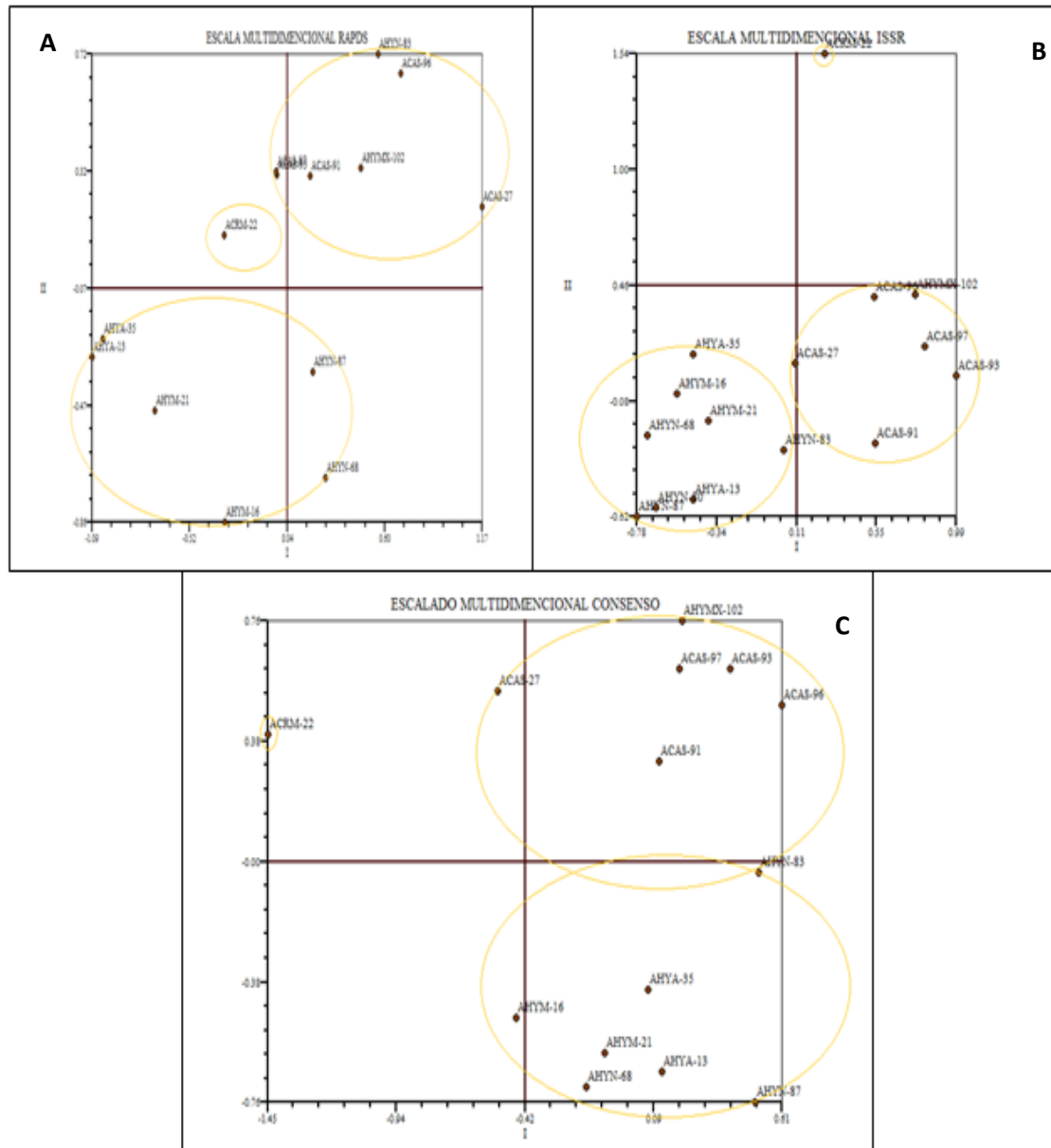


Figura 5. Distribución de grupos de los genotipos de *Amaranthus*. A. RAPD. B. ISSR. C. RAPD+ISSR.

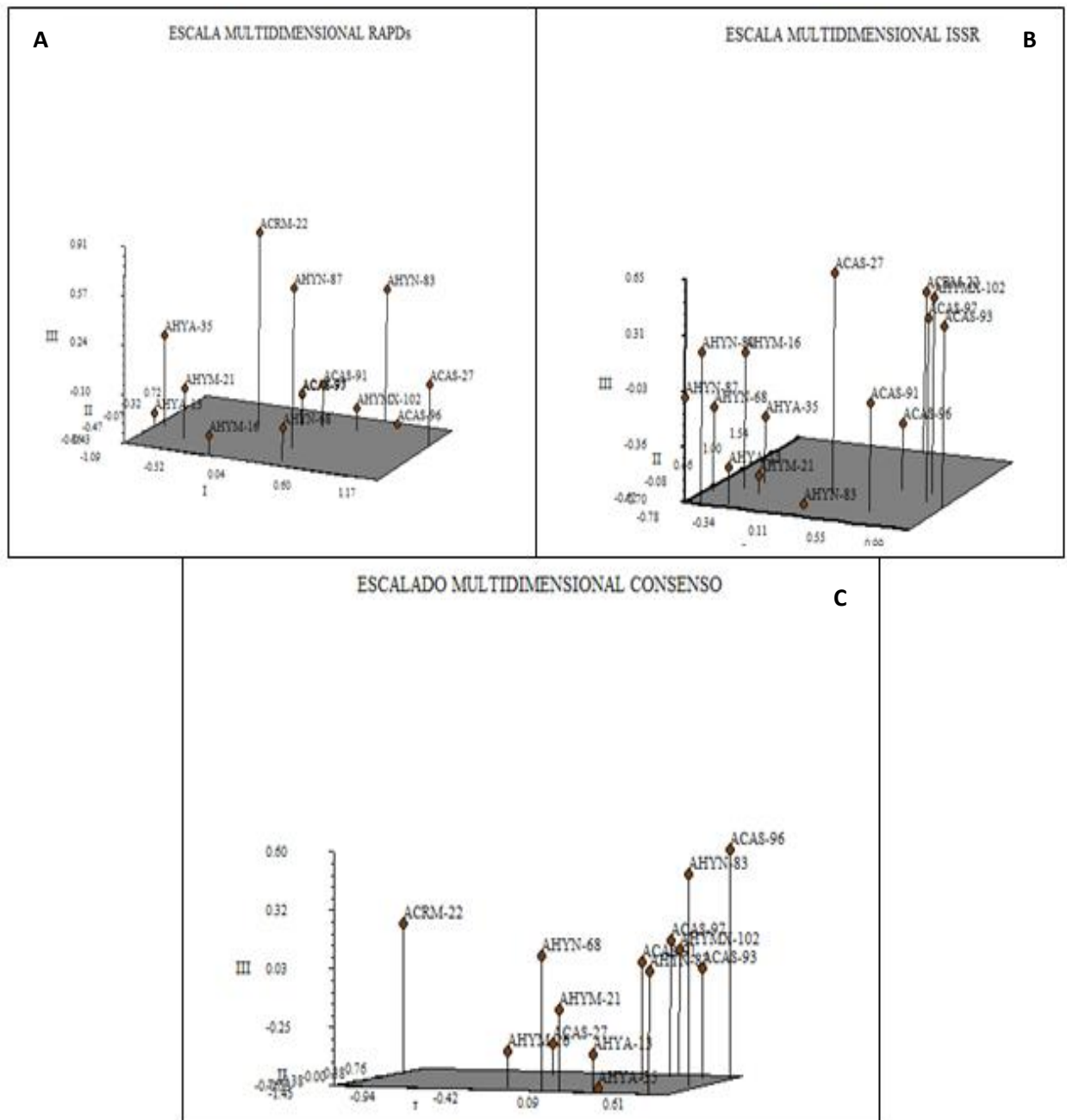


Figura 6. Gráfica en 3D mostrando la distribución de grupos de los genotipos de *Amaranthus*. A. RAPD. B. ISSR. C. RAPD+ISSR.

En los gráficos de 2D y 3D que se obtuvieron con los datos del consenso “RAPD+ISSR (Figuras 5C y 6C) se observó también la formación de tres grupos. Un grupo se constituyó solo de las diferentes razas de *A. hypochondriacus*, otro con la especie *A. caudatus* mas una raza de *A. hypochondriacus* ‘Mixteco’ y el tercero se integró con los *A. cruentus*.

Con la informacion de los analisis de escalonado multidimensional se llega a la conclusión de que se forman tres grupos principales: grupo 1: está formado por razas de *A. hypochondriacus*. Grupo 2: está formado por las razas de *A. caudatus* más la raza de *A. hypochondriacus* ‘Mixteco’. Grupo 3: se forma con la raza *A. cruentus*.

En el análisis con RAPD se observó la inclusión de *A. hypochondriacus* raza ‘Nepal’ además de la raza ‘Mixteco’ junto con *A. caudatus* en el segundo grupo, mientras que los ISSR separaron a la raza ‘Nepal’ de dicho grupo, lo que sugiere que los marcadores ISSR son más eficientes que los RAPD para discriminar razas y especies durante la caracterización de accesiones de amaranto.

4.1.2. Construcción de dendrogramas

El análisis de conglomerados de RAPD resultó en la formación de tres grupos a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.70 (Figura 7A), quedando integrados de la manera siguiente:

- Grupo 1: *A. hypochondriacus* ('Azteca' 13; 'Mercado' 21; 'Azteca' 35; 'Nepal' 87; 'Mercado' 16; 'Nepal' 68), estas razas agruparon a un coeficiente de similitud de 0.72.
- Grupo 2: *A. hypochondriacus* ('Nepal' 83; 'Mixteco' 102), *A. caudatus* ('Sudamericana' 27; 'Sudamericana' 91; 'Sudamericana' 93; 'Sudamericana' 97; 'Sudamericana' 96) estas especies y razas se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.76.
- Grupo 3: *A. cruentus* 'Mexicana' 22 esta especie se unió a las otras a un coeficiente de 0.68.

Mientras que el análisis de conglomerados de ISSR mostró también la formación de tres grupos a un coeficiente de similitud de 0.58 (Figura 7B). Los grupos se conformaron de la manera siguiente:

- Grupo 1: incluyó solo a razas de *A. hypochondriacus* ('Azteca' 13; 'Mercado' 21; 'Mercado' 16; 'Nepal' 68; 'Azteca' 35; 'Nepal' 83 y 'Nepal' 87), estas razas se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.69.
- Grupo 2: integró a *A. hypochondriacus* ('Mixteco' 102) y a *A. caudatus* ('Sudamericana' 93; 'Sudamericana' 97, 'Sudamericana' 96, 'Sudamericana' 27 y 'Sudamericana' 91; estas especies y razas agruparon a 0.62.
- Grupo 3: *A. cruentus* 'Mexicana' 22, agrupó a 0.56.

Realizando un dendrograma con los datos de consenso “RAPD + ISSR” a fin de determinar si se lograba un agrupamiento más adecuado de las especies y razas estudiadas (Figura 7C) se obtuvo la formación de tres grupos a un coeficiente de similitud de 0.66. Los grupos se distinguieron como sigue:

- Grupo 1: *A. hypochondriacus* (incluyó a las razas ‘Azteca’ 13; ‘Mercado’ 21; ‘Azteca’ 35; ‘Mercado’ 16; ‘Nepal’ 68; ‘Nepal’ 87;), estas razas unieron a 0.72 de similitud.
- Grupo 2: *A. hypochondriacus* (‘Nepal’ 83; ‘Mixteco’ 102) y *A. Caudatus* (‘Sudamericana’ 93; ‘Sudamericana’ 97; ‘Sudamericana’ 91; ‘Sudamericana’ 96; ‘Sudamericana’ 27), estas especies y razas agruparon a 0.68.
- Grupo 3: *A. cruentus* ‘Mexicana’ 22, esta especie agrupó a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.60.

Según la línea de corte de los tres dendrogramas se observa que *A. cruentus* ‘Mexicana’ es la especie-raza que se encuentra menos relacionada con *A. hypochondriacus* y *A. Caudatus* mientras que *A. hypochondriacus* y *A. Caudatus* se encuentran más relacionadas entre sí, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores como Ranade *et al.* (1997), Mandal y Das (2002) y Legaria (2010).

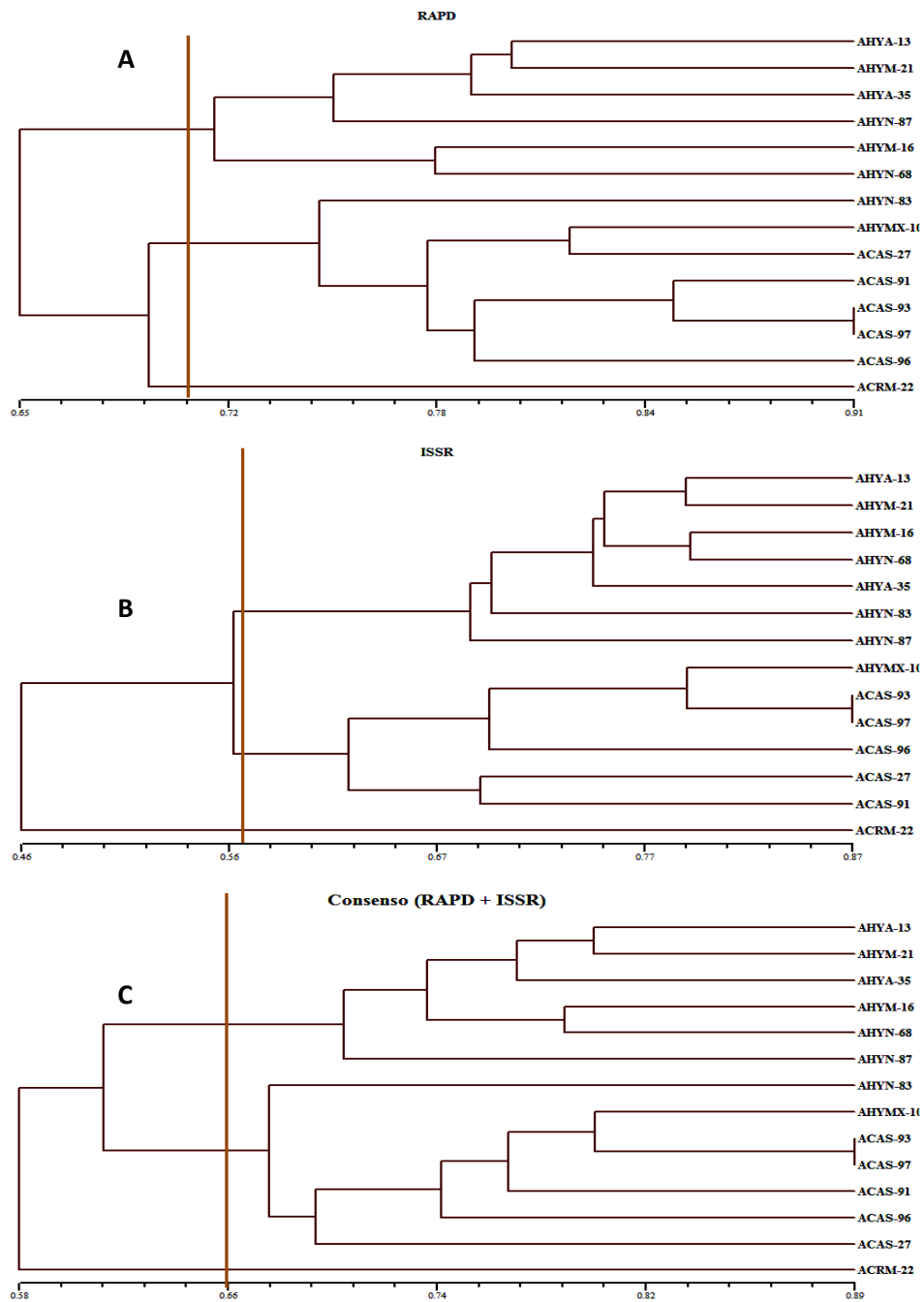


Figura 7. Dendrogramas de relaciones entre 14 genotipos de *Amaranthus*, obtenido con datos de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso "RAPD + ISSR".

4.1.3. Re-muestreo

Utilizando el programa FreeTree y el coeficiente de Jaccard se obtuvieron árboles robustos luego de 1000 re-muestreos (Figura 8A, B y C). Los valores de coeficientes de similitud de Jaccard correspondientes se muestran en los Cuadros 6A, B y C.

El dendrograma re-muestreado utilizando datos RAPD (Figura 8A) mostró la formación de solo dos grupos.

- El primer grupo integrado solo con razas de la especie *A. hypochondriacus* que incluye a 'Nepal' 68; 'Mercado' 16; 'Mercado' 21; 'Azteca' 13; 'Azteca' 35 y 'Nepal' 87.
- El segundo grupo está formado con las tres especies estudiadas *A. caudatus* ('Sudamericana' 27; 'Sudamericana' 91; 'Sudamericana' 93; 'Sudamericana' 97 y 'Sudamericana' 96), 2 razas de *A. hypochondriacus* ('Nepal' 83; 'Mixteco' 102), y a *A. cruentus* 'Mexicana' 22.

En el segundo grupo se observa que *A. hypochondriacus* está genéticamente más relacionada con *A. caudatus* que con *A. cruentus*.

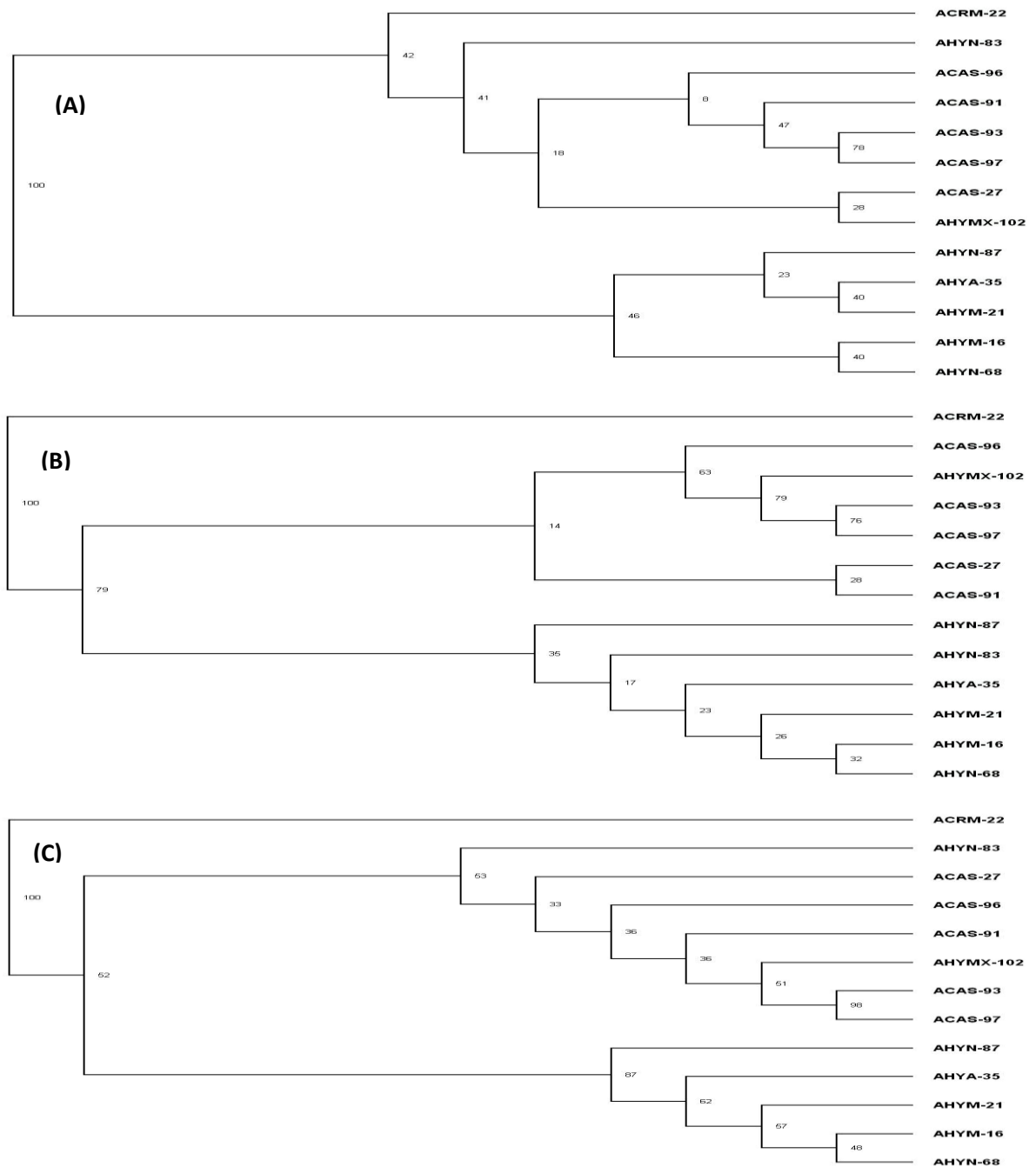


Figura 8. Dendrograma de relaciones entre genotipos de *Amaranthus* obtenido utilizando datos de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso (RAPD + ISSR), con 1000 re-muestrados.

Cuadro 6. Valores de similitud genética de re-muestreo de: A. RAPD, B. ISSR y C. Consenso (RAPD + ISSR).

(A) RAPD													
	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
AHYA-35		0.69091	0.8	0.67273	0.60656	0.75	0.63934	0.70175	0.60656	0.68852	0.75439	0.58065	0.71186
AHYM-16	0.69091		0.77778	0.78	0.61017	0.67213	0.61667	0.62069	0.61017	0.63934	0.67241	0.61017	0.66102
AHYM-21	0.8	0.77778		0.79245	0.60317	0.74194	0.66129	0.69492	0.60317	0.70968	0.68852	0.60317	0.67742
AHYN-68	0.67273	0.78	0.79245		0.67857	0.68333	0.62712	0.63158	0.62069	0.65	0.62712	0.62069	0.64407
AHYN-83	0.60656	0.61017	0.60317	0.67857		0.64615	0.72881	0.65	0.66667	0.77966	0.75862	0.78571	0.74576
AHYN-87	0.75	0.67213	0.74194	0.68333	0.64615		0.65152	0.68254	0.67188	0.72308	0.73016	0.64615	0.69231
AHYMX-102	0.63934	0.61667	0.66129	0.62712	0.72881	0.65152		0.68333	0.82143	0.84483	0.7931	0.82143	0.81034
ACRM-22	0.70175	0.62069	0.69492	0.63158	0.65	0.68254	0.68333		0.73684	0.76271	0.68333	0.59677	0.72881
ACAS-27	0.60656	0.61017	0.60317	0.62069	0.66667	0.67188	0.82143	0.73684		0.77966	0.7	0.75439	0.71667
ACAS-91	0.68852	0.63934	0.70968	0.65	0.77966	0.72308	0.84483	0.76271	0.77966		0.84483	0.81034	0.86207
ACAS-93	0.75439	0.67241	0.68852	0.62712	0.75862	0.73016	0.7931	0.68333	0.7	0.84483		0.78947	0.90909
ACAS-96	0.58065	0.61017	0.60317	0.62069	0.78571	0.64615	0.82143	0.59677	0.75439	0.81034	0.78947		0.77586
ACAS-97	0.71186	0.66102	0.67742	0.64407	0.74576	0.69231	0.81034	0.72881	0.71667	0.86207	0.90909	0.77586	

(B) ISSR													
	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
AHYA-35		0.73469	0.72222	0.75	0.7069	0.64516	0.5	0.5	0.67347	0.67925	0.53846	0.60784	0.56604
AHYM-16	0.73469		0.76	0.79167	0.62069	0.64407	0.58333	0.48837	0.71111	0.64706	0.53061	0.54	0.59184
AHYM-21	0.72222	0.76		0.77358	0.72881	0.66667	0.52727	0.44	0.60377	0.67273	0.50909	0.57407	0.53571
AHYN-68	0.75	0.79167	0.77358		0.69492	0.77586	0.49091	0.42857	0.56604	0.57895	0.5	0.59615	0.55556
AHYN-83	0.7069	0.62069	0.72881	0.69492		0.65672	0.57895	0.41818	0.59649	0.66102	0.5614	0.65455	0.58621
AHYN-87	0.64516	0.64407	0.66667	0.77586	0.65672		0.45313	0.37288	0.51613	0.55385	0.46032	0.54098	0.48438
AHYMX-102	0.5	0.58333	0.52727	0.49091	0.57895	0.45313		0.5	0.65909	0.63265	0.775	0.69767	0.80488
ACRM-22	0.5	0.48837	0.44	0.42857	0.41818	0.37288	0.5		0.5641	0.47826	0.475	0.45238	0.47619
ACAS-27	0.67347	0.71111	0.60377	0.56604	0.59649	0.51613	0.65909	0.5641		0.6875	0.63636	0.48	0.63043
ACAS-91	0.67925	0.64706	0.67273	0.57895	0.66102	0.55385	0.63265	0.47826	0.6875		0.68085	0.58824	0.67347
ACAS-93	0.53846	0.53061	0.50909	0.5	0.5614	0.46032	0.775	0.475	0.63636	0.68085		0.67442	0.87179
ACAS-96	0.60784	0.54	0.57407	0.59615	0.65455	0.54098	0.69767	0.45238	0.48	0.58824	0.67442		0.70455
ACAS-97	0.56604	0.59184	0.53571	0.55556	0.58621	0.48438	0.80488	0.47619	0.63043	0.67347	0.87179	0.70455	

(C) Consenso "RAPD + ISSR"													
	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
AHYA-35		0.71154	0.76147	0.71028	0.65546	0.69672	0.57391	0.61165	0.63636	0.68421	0.65138	0.59292	0.64286
AHYM-16	0.71154		0.76923	0.78571	0.61538	0.65833	0.60185	0.56436	0.65385	0.64286	0.60748	0.57798	0.62963
AHYM-21	0.76147	0.76923		0.78302	0.66393	0.704	0.59829	0.57798	0.60345	0.69231	0.60345	0.58974	0.61017
AHYN-68	0.71028	0.78571	0.78302		0.68696	0.72881	0.5614	0.53774	0.59459	0.61538	0.56637	0.60909	0.60177
AHYN-83	0.65546	0.61538	0.66393	0.68696		0.65152	0.65517	0.53913	0.63248	0.72034	0.66087	0.72072	0.66667
AHYN-87	0.69672	0.65833	0.704	0.72881	0.65152		0.55385	0.53279	0.59524	0.63846	0.59524	0.59524	0.58915
AHYMX-102	0.57391	0.60185	0.59829	0.5614	0.65517	0.55385		0.61	0.75	0.74766	0.78571	0.76768	0.80808
ACRM-22	0.61165	0.56436	0.57798	0.53774	0.53913	0.53279	0.61		0.66667	0.6381	0.6	0.53846	0.62376
ACAS-27	0.63636	0.65385	0.60345	0.59459	0.63248	0.59524	0.75	0.66667		0.73832	0.67308	0.62617	0.67925
ACAS-91	0.68421	0.64286	0.69231	0.61538	0.72034	0.63846	0.74766	0.6381	0.73832		0.77143	0.70642	0.7757
ACAS-93	0.65138	0.60748	0.60345	0.56637	0.66087	0.59524	0.78571	0.6	0.67308	0.77143		0.74	0.89362
ACAS-96	0.59292	0.57798	0.58974	0.60909	0.72072	0.59524	0.76768	0.53846	0.62617	0.70642	0.74		0.7451
ACAS-97	0.64286	0.62963	0.61017	0.60177	0.66667	0.58915	0.80808	0.62376	0.67925	0.7757	0.89362	0.7451	

El dendrograma re-muestreado utilizando datos ISSR (Figura 8B) mostró la formación de tres grupos, de forma parecida al árbol obtenido sin el re-muestreo.

- Un primer grupo estuvo formado por los *A. hypochondriacus* ('Azteca' 13; 'Mercado' 21; 'Mercado' 16; 'Nepal' 68; 'Azteca' 35; 'Nepal' 83 y 'Nepal' 87).
- El segundo grupo integró especialmente a los *A. caudatus* ('Sudamericana' 93; 'Sudamericana' 97; 'Sudamericana' 96; 'Sudamericana' 27; 'Sudamericana' 91) y a una raza de *A. hypochondriacus* ('Mixteco' 102).
- El tercer grupo formado por *A. cruentus* 'Mexicana' 22.

El dendrograma re-muestreado utilizando datos de consenso "RAPD + ISSR" (Figura 8C) mostró la formación de tres grupos.

- El primer grupo se formó con los *A. hypochondriacus* ('Azteca' 13; 'Mercado' 21; 'Azteca' 35; 'Mercado' 16; 'Nepal' 68 y 'Nepal' 87).
- El segundo grupo integro a los *A. caudatus* ('Sudamericana' 93; 'Sudamericana' 97; 'Sudamericana' 91; 'Sudamericana' 96; 'Sudamericana' 27) y *A. hypochondriacus* (razas 'Nepal' 83 y 'Mixteco' 102).
- El tercer grupo lo formó *A. Cruentus* 'Mexicana' 22.

En general, los dendrogramas obtenidos con el programa NTSYSpc versión 2.2 sin re-muestreo y los dendrogramas con re-muestreo obtenidos usando el programa FreeTree mostraron relaciones de similitud semejantes entre los genotipos evaluados.

Se observó que el *A. cruentus* 'Mexicana' es la raza que se encuentra menos relacionada con *A. hypochondriacus* y *A. Caudatus* mientras que *A. hypochondriacus* y *A. Caudatus* se encuentran más relacionadas entre sí. Estos resultados coinciden con los reportados por Ranade *et al.* (1997), Mandal y Das (2002) y Legaria (2010).

4.1.4. Prueba de Mantel

Se realizó una prueba de Mantel para determinar el valor de correlación existente entre los árboles obtenidos con marcadores RAPD vs ISSR, RAPD vs Consenso (RAPD+ISSR) e ISSR vs Consenso (RAPD+ISSR). Los resultados se muestran en las Figuras 9A, B y C.

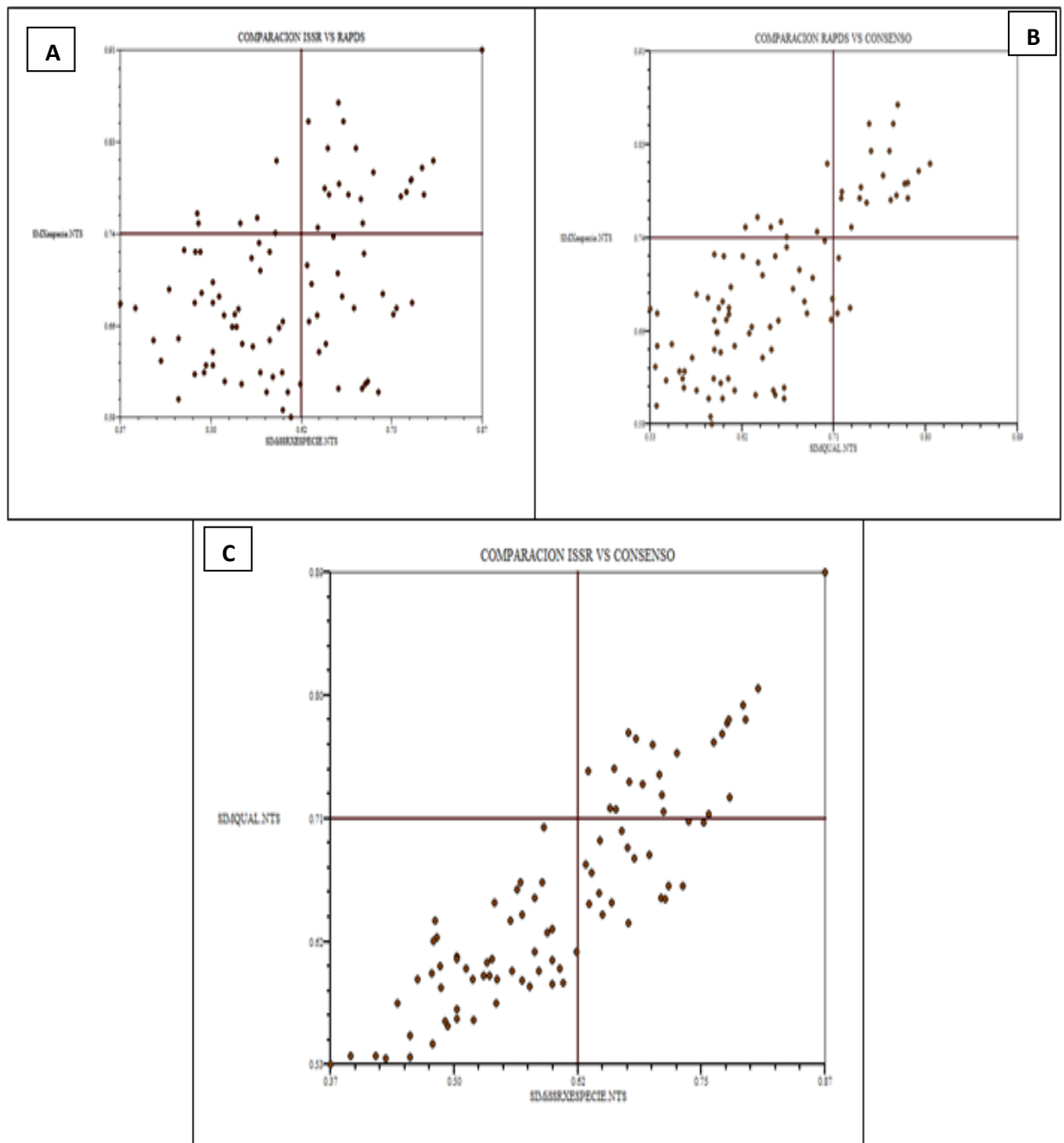


Figura 9. Correlación entre marcadores: A. RAPD vs ISSR; B. RAPD vs Consenso y C. ISSR vs Consenso.

Cuadro 7. Valores de correlación obtenidos con la prueba de Mantel.

Marcadores	Correlación de Mantel
RAPD vs ISSR	0.42 ^{**}
RAPD vs consenso (RAPD + ISSR)	0.79 ^{**}
ISSR vs consenso (RAPD + ISSR)	0.88 ^{**}

^{**} = Altamente significativa

La prueba de Mantel para determinar correlación entre los árboles obtenidos con marcadores RAPD vs ISSR arrojó un valor de $r=0.42$, lo que indica que los datos de los dos marcadores dan origen a árboles muy diferentes. En la Figura 9A se muestra la carencia de correlación entre los dos marcadores.

La prueba de Mantel para identificar la correlación que hay entre los resultados de consenso “RAPD + ISSR” versus los resultados obtenidos con los RAPD generó un valor de $r=0.79$. La Figura 9B muestra el grado de correlación existente entre los datos generados con ambos marcadores.

De las Figura 9A, B y C y del Cuadro 7 se infiere que la suma de marcadores RAPD mas ISSR (consenso) permite obtener un árbol más robusto y hace a los marcadores RAPD más útiles y confiables que cuando se aplican por separado para el agrupamiento e identificación de genotipos de *Amaranthus*.

La prueba de Mantel para determinar la correlación que hay entre los resultados de consenso “RAPD + ISSR” versus los resultados obtenidos con los ISSR dio como

resultado un valor de correlación $r=0.88$ (Figura 9C). Esta información sugiere que los ISSR son muy confiables para establecer relaciones genéticas entre especies de *Amaranthus*. También nos indica que para el propósito mencionado son superiores a los RAPD.

4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE POBLACIONES

La prueba de calidad del ADN indicó que el protocolo utilizado para la extracción de ADN de individuos integrantes de las poblaciones evaluadas fue aceptable dado que durante la electroforesis en gel de agarosa se observó la presencia de una banda bien definida y de alto peso molecular para la mayoría de las accesiones (Figura 10).

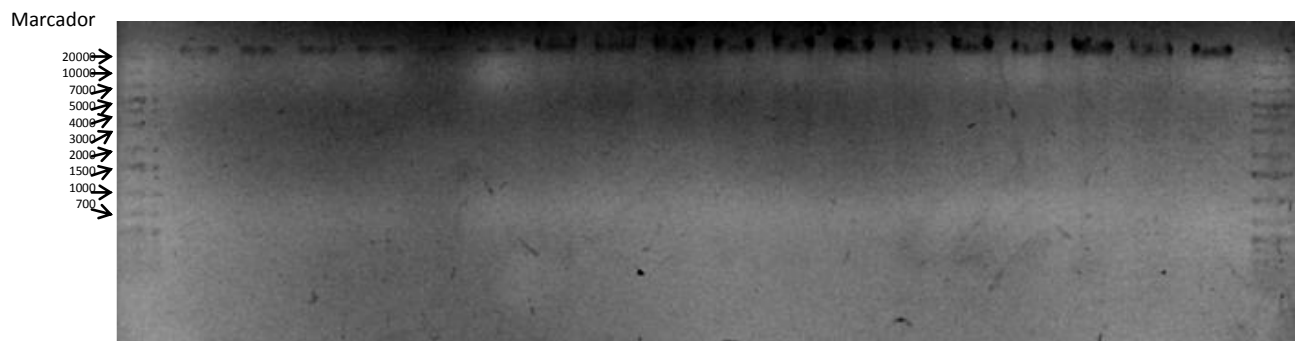


Figura 10. Gel de calidad de ADN para análisis de las poblaciones.

Los iniciadores de RAPD e ISSR utilizados permitieron detectar la presencia de polimorfismo en los individuos evaluados entre y dentro de las poblaciones evaluadas. En este trabajo se consideró a especies y sus razas como poblaciones (Figuras 11 y 12).

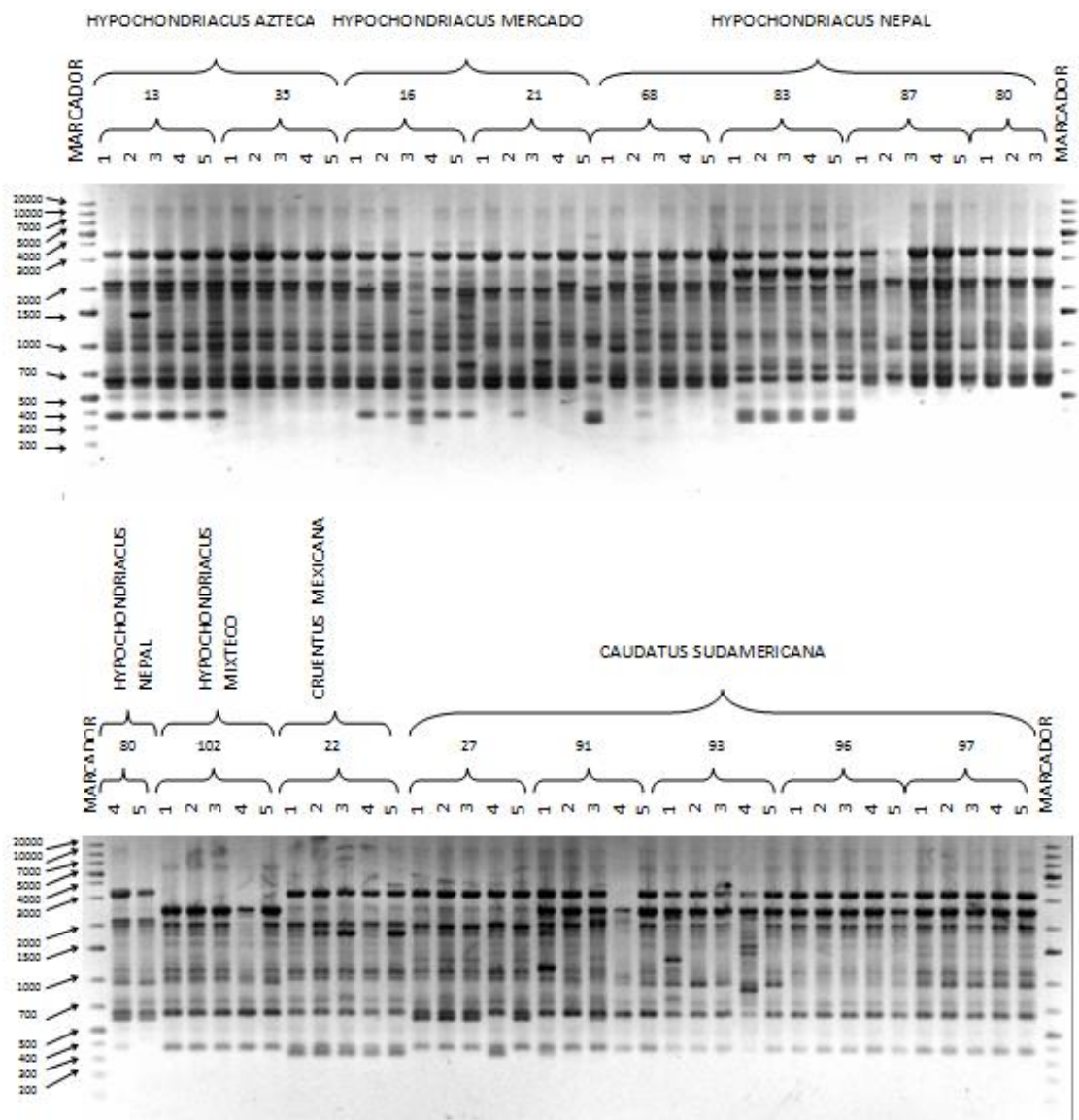


Figura 11. Patrones de bandeo RAPD de los genotipos de *Amaranthus* evaluados con el iniciador A02, para el análisis de poblaciones.

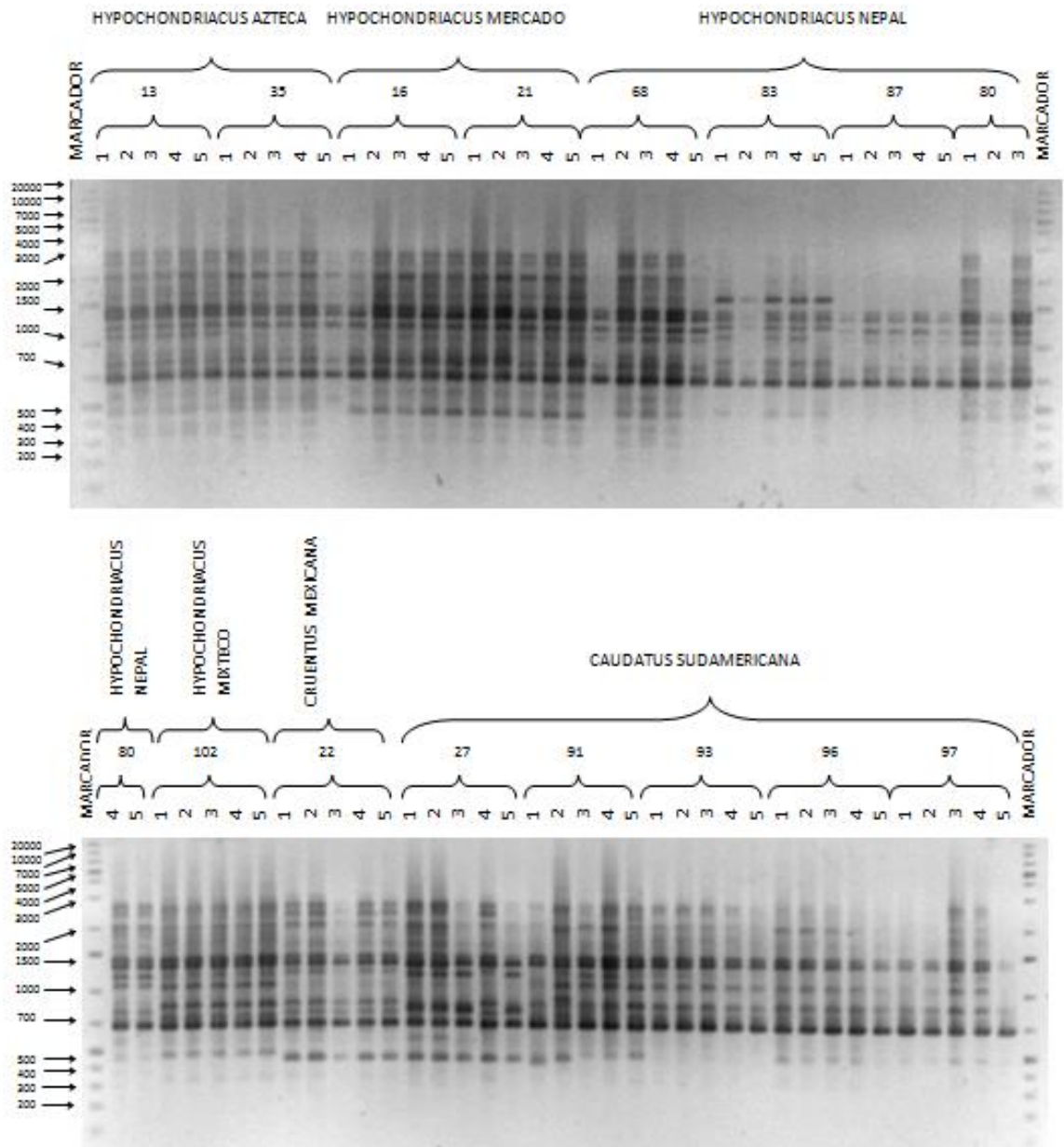


Figura 12. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de *Amaranthus* evaluados con el iniciador P1, para análisis de poblaciones.

Los iniciadores que generaron mayor número de bandas fueron los RAPD presentándose un total de 75 bandas con las cuales se elaboró una matriz básica de datos con 5,625 caracteres.

En cambio con los iniciadores ISSR se obtuvo un total 61 bandas lo que permitió la elaboración de una matriz básica de datos con 4,575 caracteres (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de bandas obtenidas por iniciador en el análisis de las poblaciones.

Iniciadores	Secuencia	Núm. Total de	Núm. Total de bandas	% de polimorfismos
RAPD		Bandas	polimórficas	
A02	5'-TGC CGA GCT G-3'	17	16	94
A09	5'-GGG TAA CGC C-3'	17	15	88
A20	5'-GTT GCG ATC C-3'	14	11	79
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'	11	10	91
B06	5'-TGC TCT GGC C-3'	8	7	88
B15	5'-GGA GGG TGT T-3'	8	8	100
ISSR				
A9	5'-CACACACACACACA-3'	5	5	100
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'	13	12	92
P1	5'-GAGCAACAACAACAACAA-3'	13	12	92
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'	9	6	67
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG-3'	12	12	100
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	9	8	89
Total de bandas		136	122	

Los iniciadores RAPD detectaron porcentajes de polimorfismo entre 79 y 100 %, mientras que los ISSR entre 67 y 100 % (Cuadro 8).

Los datos obtenidos con los iniciadores RAPDs e ISSRs se unieron para realizar el análisis de las poblaciones.

En el Cuadro 9 se presentan los valores de identidad (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre las 15 poblaciones evaluadas.

Las poblaciones más relacionadas fueron *A. hypochondriacus* 'Nepal' 87 con *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80; y *A. hypochondriacus* 'Nepal' 58 con *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80, con valores de identidad de 0.93 y 0.91, respectivamente.

Las poblaciones menos relacionadas genéticamente fueron *A. hypochondriacus* 'Azteca' 35 con *A. hypochondriacus* 'Mercado' 16 con un valor de identidad igual a 0.33.

Los valores de identidad entre todas las poblaciones estuvieron en un rango entre 0.33 y 0.93 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para 15 poblaciones de amaranto.

	AHYA13	AHYA35	AHYM16	AHYM21	AHYN58	AHYN83	AHYN87	AHYN80	AHYMX102	ACRM22	ACAS27	ACAS91	ACAS93	ACAS96	ACAS97
AHYA13		0.8973	0.846	0.8229	0.8529	0.6857	0.7831	0.8047	0.7244	0.7148	0.7676	0.7508	0.7638	0.7565	0.722
AHYA35	0.1083		0.3268	0.827	0.8126	0.6978	0.7406	0.7769	0.7599	0.7195	0.736	0.74	0.7543	0.739	0.7078
AHYM16	0.1672	0.1902		0.8764	0.7775	0.6644	0.7446	0.7606	0.7230	0.6823	0.7961	0.737	0.747	0.7098	0.6935
AHYM21	0.1949	0.1899	0.1319		0.8506	0.7488	0.7899	0.8210	0.8072	0.7638	0.8217	0.8135	0.7904	0.7531	0.7332
AHYN58	0.1592	0.2074	0.2516	0.1618		0.7934	0.905	0.9111	0.7377	0.7522	0.7698	0.7336	0.7441	0.7194	0.6861
AHYN83	0.3773	0.3599	0.4088	0.2893	0.2315		0.7479	0.7466	0.7423	0.7377	0.7422	0.757	0.7304	0.7695	0.7383
AHYN87	0.2445	0.3003	0.2949	0.2358	0.0998	0.2905		0.9313	0.6502	0.704	0.7556	0.6916	0.7004	0.6669	0.6834
AHYN80	0.2173	0.2524	0.2737	0.1972	0.0931	0.2922	0.0712		0.6979	0.7514	0.7911	0.7348	0.7354	0.7024	0.6829
AHYMX102	0.3225	0.2746	0.3244	0.2142	0.3042	0.298	0.4305	0.3597		0.8059	0.7838	0.8151	0.7707	0.7581	0.7167
ACRM22	0.3358	0.3292	0.3823	0.2694	0.2848	0.3042	0.351	0.2858	0.2158		0.8374	0.7896	0.7282	0.7071	0.6861
ACAS27	0.2645	0.3065	0.2281	0.1964	0.2616	0.2982	0.2803	0.234	0.2436	0.1774		0.8542	0.7889	0.7727	0.7643
ACAS91	0.2866	0.301	0.3051	0.2064	0.3098	0.2783	0.3687	0.3082	0.2044	0.2362	0.1576		0.9029	0.8893	0.8479
ACAS93	0.2695	0.2819	0.2917	0.2352	0.2956	0.3141	0.3561	0.3074	0.2604	0.3172	0.2371	0.1022		0.8847	0.8767
ACAS96	0.279	0.3024	0.3427	0.2836	0.3293	0.262	0.4051	0.3533	0.2769	0.3466	0.2578	0.1173	0.1225		0.8735
ACAS97	0.3257	0.3456	0.366	0.3104	0.3768	0.3034	0.3807	0.3814	0.333	0.3768	0.2689	0.165	0.1316	0.1352	

Al evaluar parámetros que definen la estructura de las poblaciones (Cuadro 10) se encontró diferencias entre las poblaciones en relación al grado de polimorfismo entre sus individuos. Las poblaciones que mostraron el mayor porcentaje de polimorfismo fueron *A. hypochondriacus* ‘Nepal’ 80 y *A. caudatus* ‘Sudamericana’ 91, ambas con un valor de 35.29 %. En contraste la población con menor polimorfismo entre sus individuos fue *A. cruentus* ‘Mexicana’ 22 con un valor de 13.97 %; el resto de las poblaciones presentó un polimorfismo en un rango de 18.38 a 34.56 %. Por otro lado, el polimorfismo entre todas las poblaciones fue de 89.71 %.

La diversidad genética de Nei de las poblaciones (H) varió de 0.053 a 0.137, ello sugiere que la diversidad genética dentro de las poblaciones no es muy alta o presentan uniformidad entre los individuos. Pero al hacer la comparación entre todas las poblaciones se observa que la diversidad genética aumenta a 0.295.

La población con mayor diversidad genética fue *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80 y la menos diversa fue *A. cruentus* 'Mexicana' 22 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de amaranto, con base en los patrones RAPD y ISSR.

Poblacion	loci polimorficos	P (%)	H	Dev. Estandar	I	Dev. Estandar	Na	Dev. Estandar	Ne	Dev. Estandar	Gst	Nm
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Azteca 13	40	29.41	0.1058	0.1782	0.158	0.2579	1.2941	0.4573	1.183	0.3302		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Azteca 35	25	18.38	0.0706	0.1585	0.1037	0.2276	1.1838	0.3888	1.1258	0.2973		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Mercado 16	33	24.26	0.084	0.1625	0.1264	0.2362	1.2426	0.4303	1.144	0.3002		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Mercado 21	38	27.94	0.1169	0.1965	0.1686	0.2791	1.2794	0.4504	1.2143	0.3735		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Nepal 58	41	30.15	0.1322	0.2094	0.1886	0.2949	1.3015	0.4606	1.2489	0.4042		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Nepal 83	36	26.47	0.1055	0.1883	0.1534	0.2675	1.2647	0.4428	1.1926	0.3595		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Nepal 87	37	27.21	0.1089	0.1905	0.1583	0.2706	1.2721	0.4467	1.199	0.3637		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Nepal 80	48	35.29	0.1372	0.1981	0.2014	0.2843	1.3529	0.4797	1.2424	0.3694		
<i>Amaranthus Hypochondriacus</i> Mexicana 102	26	19.12	0.0774	0.1692	0.1122	0.2401	1.1912	0.3947	1.1427	0.3252		
<i>Amaranthus Cruentus</i> Mexicana 22	19	13.97	0.0531	0.1406	0.0782	0.2023	1.1397	0.348	1.0946	0.2634		
<i>Amaranthus Caudatus</i> Sudamerica 27	47	34.56	0.1254	0.1915	0.1861	0.2737	1.3456	0.4773	1.2221	0.366		
<i>Amaranthus Caudatus</i> Sudamerica 91	48	35.29	0.1307	0.1921	0.1939	0.2765	1.3529	0.4797	1.2278	0.3564		
<i>Amaranthus Caudatus</i> Sudamerica 93	41	30.15	0.0993	0.1654	0.1517	0.244	1.3015	0.4606	1.1632	0.2943		
<i>Amaranthus Caudatus</i> Sudamerica 96	25	18.38	0.0724	0.1635	0.1054	0.2325	1.1838	0.3888	1.1325	0.3135		
<i>Amaranthus Caudatus</i> Sudamerica 97	24	17.65	0.0646	0.1486	0.0962	0.2162	1.1765	0.3826	1.1113	0.2708		
Entre poblaciones	122	89.71	0.2954	0.1755	0.4441	0.2345	1.8971	0.305	1.5051	0.3526	0.665	0.2518

p (%) = porcentaje de polimorfismos, Na = Numero de alelos observados, Ne = Numero de alelos efectivos, H = diversidad genetica (Nei), I = diversidad de Shannon, Nm = numero de individuos migrantes, Gst = coeficiente de diferenciacion entre poblaciones, Z = Desviacion estandar.

Otro dato importante mostrado en el Cuadro 10, fue la estimación del número de individuos migrantes, relacionado con el grado de flujo genético (Nm = 0.2518), que indica que hay menos de un individuo migrante entre las poblaciones, lo cual concuerda con el estudio realizado por Jain (1982) que indica que la polinización cruzada entre poblaciones de *Amaranthus* es baja, en un rango de 3 a 25 %. Según Sauer (1976), las variaciones en los porcentajes de flujo de genes están en función directa con la anatomía de la planta, barreras

geográficas, expresión genética, interacción ambiental e interacción genotipo-ambiente.

El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue $G_{st} = 0.665$ (66.5%), lo que indica que las poblaciones están altamente diferenciadas. Ello establece también que aproximadamente 66.5 % de la variación detectada se debe a diferencias entre las poblaciones. El resto (33.5 %) representa diversidad genética dentro de las poblaciones.

El análisis de poblaciones indicó que los materiales con mayor variabilidad genética fueron *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80 seguido de los materiales *A. caudatus* 'Sudamericana' 91, *A. hypochondriacus* 'Nepal' 58 y *A. caudatus* 'Sudamericana' 27; esta variabilidad genética detectada sugiere que el germoplasma de estas colecciones representa un alto potencial en la búsqueda de alelos de interés para mejoramiento genético del género y las especies.

V. CONCLUSIONES

1. Se detectó variabilidad genética entre los materiales de *Amaranthus spp.*, evaluados.
2. Los análisis de RAPD e ISSR revelaron que las especies más cercanamente relacionadas son *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* y la más alejada es *A. cruentus*.
3. Los marcadores ISSR fueron superiores a los marcadores RAPD en el proceso de agrupamiento y discriminación de razas y especies de *Amaranthus*.
4. En *Amaranthus* la mayor parte de la diversidad genética detectable se encuentra entre las especies y razas, con una menor proporción de variación dentro de especies y razas.
5. Los materiales con mayor variabilidad genética fueron *A. hypochondriacus* 'Nepal' 80 seguido de los materiales *A. caudatus* 'Sudamericana' 91, *A. hypochondriacus* 'Nepal' 58 y *A. caudatus* 'Sudamericana' 27.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Bornet, B. y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
- Carballo C.; Ramirez E. 2006. Manual gráfico para la descripción varietal en amaranto (*Amaranthus spp*). SNICS y Colegio de Postgraduados. Texcoco-Mexico D.F. p: 5-6.
- Chagaray C.P.N. 2005. Estudio de Factibilidad del cultivo del Amaranto. Dirección Provincial de Programación del Desarrollo. Ministerio de Producción y Desarrollo. Gobierno de la Provincia de Catamarca. Disponible en <http://www.produccioncatamarca.gov.ar>.
- Claros D., M. G. 1998. Marcadores moleculares: que son, como se obtienen, y para que valen. *Encuentros en la Biología* 49. Universidad de Malaga. Disponible en línea: <Http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.htm> I (consultado el 20 de noviembre de 2011).
- De la Cruz M., F. Ramirez, H. Hernández (1997) DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:319-325.

- Dehmer. K. J. 2003. Molecular diversity in the genus *Amaranthus*. In: Schriften zu Genetischen Ressourcen. Knüpfner, H., J. Ochsmann (eds.). band 22. Rudolf Mansfeld and Plant Genetic Resources, Zadi, Bonn, Germany, pp. 208-215.
- Feine, L., R. R. Harwood, C. S. Kauffman, and J. P. Senft. 1979. Amaranth; gentle giant of the past and future. In: New Agricultural Crops. G. A. Ritchie (ed.). A. A. A. S. Selected Symposium 38. Westview Press. Boulder, CO. pp. 41-63.
- Grubben, G. J. H. and D. H. van Sloten. 1981. Genetic resources of amaranths. A global plan of action. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 63 p.
- Gupta V. K., S. Gudu; 1991; Interspecific hybrids and possible phylogenetic relations in grain amaranths. Euphytica 52:33-38.
- INEGI, 1998. Producción, Industrialización comercialización del Amaranto en el Distrito Federal, Notas revista de información y análisis numero 6. 41 p.
- Jain S. K., H. Hauptli, K. R. Vaidya. 1982. Outcrossing rate in grain amaranths. Journal Heredity 73: 71-72.
- Kauffman, C.S. 1981. Grain amaranth varietal improvement: breeding program. Rodale Press, Inc., Emmaus, PA. 75p.
- Kauffman, C.S. and C. Reider. 1984. Rodale Amaranth Germplasm Collection. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. 81p.

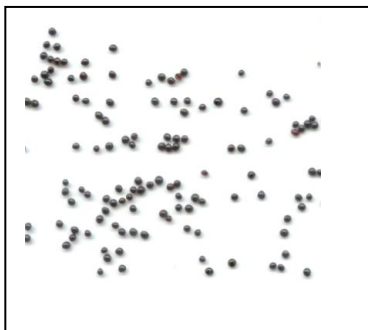
- Kauffman C.S. 1986. Observaciones sobre las investigaciones preliminares para el desarrollo de variedades mejoradas de amaranto de grano en cinco países. *In*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. El Amaranto *Amaranthus spp.* (Alegría), su Cultivo y Aprovechamiento. A Trinidad S, F Gómez L, G Suárez R (comps). México. 577 p.
- Legaria SJP. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus spp.*). Revista Fitotecnia Mexicana 33(2): 89-95.
- Mandal N., P. K. Das. 2002. Intra- and interespecific genetic diversity in grain *Amaranthus* using random amplified polymorphic DNA markers. Plant Tissue Culture 12:49-56.
- Mendoza-Herrera, A. y J. Simpson. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. XV Aniversario de la Unidad Irapuato. Avances y Perspectivas 16: 53-57.
- Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 597-602.
- National Research Council. 1984. Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop. National Academy Press. Washington, D.C. 81 p.
- Nei, M. and W.H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 5269-5273.

- Rallo L., Barranco D., Caballero JM., Del Rio C., Martin A., Tous J., Trujillo I. (Editores). 2005. *Variedades de olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Pag 15-20
- Ranade S. A., Kumar Anil, Goswami Manta, Farooqui Nuzhat and Sane P. V. 1997. Genome analysis of amaranths: Determination of inter and intra-species variations; *Journal Bioscience* 22(4):457-464.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, & H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sauer, J. D. 1950. The grain Amaranths a survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-632.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographical survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54: 103-137.
- Sauer, J. D. 1976. Grain amaranths. *In*: Evolution of Crop plants. N W Simmonds (ed). Longman Group Limited, London. pp:4-7.
- Staub, J. E., V. Meglic, L. K. Crubaugh, and L. D. Knerr. 1996. Cucumber germplasm; isozyme genetic stocks W6743, W6744, W6745. *HortSci.* 31: 1243-1245.

- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147 p.
- Wassom, J. J. and P. J. Tranel. 2005. Amplified Fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species. *Journal of Heredity* 96(4): 410-416.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle, 1999. POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software.
<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh/>.

VII. ANEXOS

7.1. Características de las semillas de razas de amaranto.



A. Hypochondriacus
'Azteca' café-oscuro



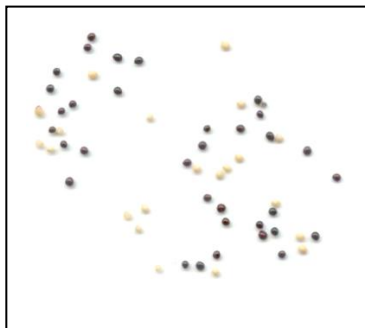
A. Hypochondriacus
'Azteca' Blanco



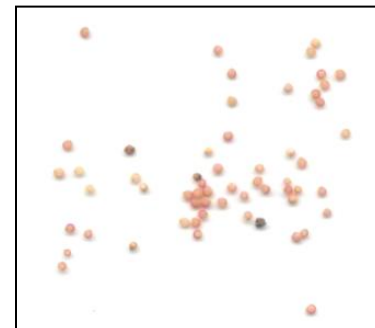
A. Hypochondriacus
'Mercado' blanco



A. Hypochondriacus
'Mercado' café



A. Hypochondriacus
'Nepal' Blanco-negro



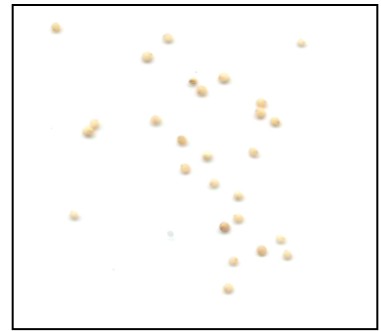
A. Hypochondriacus
'Nepal' rosado



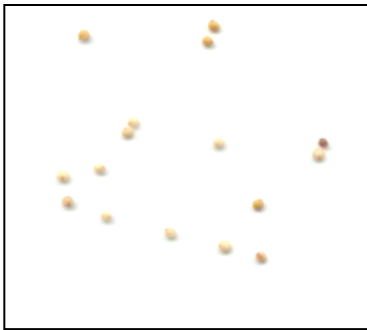
A. Hypochondriacus
'Nepal' blanco



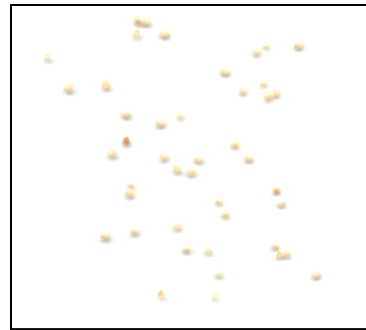
A. Hypochondriacus
'Mixteco' cristalino



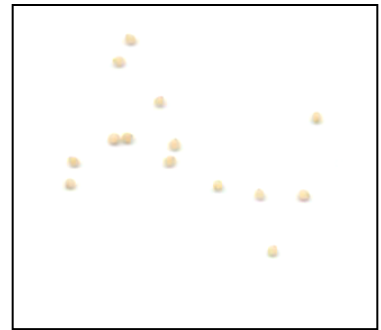
A. Cruentus 'Mexicana'
blanco



A. Caudatus
'Sudamericana' blanco-
café



A. Caudatus
'Sudamericana' blanco



A. Caudatus 'Sudamericana'
cristalino



A. Caudatus 'Sudamericana'
negro-blanco

7.2. Matriz de RAPD para la caracterización de especies y razas de amaranto.

	Genotipos de amaranto													
Bandas	AHYA-13	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
B1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
B2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
B3	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
B4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B7	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
B4	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B7	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B8	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
B9	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
B1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
B4	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
B6	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
B8	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
B6	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

0 = ausencia de banda; 1 = presencia de banda

7.3. Matriz de ISSR para la caracterización de especies y razas de amaranto.

	Genotipos de amaranto													
Bandas	AHYA-13	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
B1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	0	1		1	0	0	0	0	0	1	0
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
B5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
B3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
B4	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B5	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
B3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
B1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
B2	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B5	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
B3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
B4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
B8	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
B8	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
B8	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
B8	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B2	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
B5	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
B2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
B3	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

0 = ausencia de banda; 1 = presencia de banda

7.4. Matriz de Consenso (RAPD + ISSR) para la caracterización de especies y razas de amaranto.

	Genotipos de Amaranto													
Bandas	AHYA-13	AHYA-35	AHYM-16	AHYM-21	AHYN-68	AHYN-83	AHYN-87	AHYMX-102	ACRM-22	ACAS-27	ACAS-91	ACAS-93	ACAS-96	ACAS-97
A02(1)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
A02(2)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
A02(3)	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
A02(4)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
A02(5)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A02(6)	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
A02(7)	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
A02(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A02(9)	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A02(10)	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
A02(11)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A02(12)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A09(1)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A09(2)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A09(3)	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
A09(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A09(5)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A09(6)	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
A09(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A09(8)	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A09(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A09(10)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A20(1)	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A20(2)	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
A20(3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
A20(4)	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
A20(5)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A20(6)	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
A20(7)	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
A20(8)	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
A20(9)	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
B01(1)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B01(2)	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B01(3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B01(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B01(5)	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
B01(6)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
B01(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B01(8)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
B01(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B01(10)	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
B04(1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B04(2)	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
B04(3)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
B04(4)	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B04(5)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
B04(6)	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
B04(7)	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
B04(8)	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B04(9)	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(1)	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(2)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B06(3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(4)	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
B06(5)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
B06(6)	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B06(7)	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B06(10)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(2)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(3)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(5)	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B15(6)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B15(10)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A1(1)	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A1(2)	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
A1(3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A1(4)	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
A1(5)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1(6)	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A1(7)	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A2(1)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A2(2)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
A2(3)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A2(4)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A2(5)	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A4(1)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A4(2)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A4(3)	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
A4(4)	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
A4(5)	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A9(1)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
A9(2)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
A9(3)	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
A10(1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
A10(2)	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
A10(3)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
A10(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
A10(5)	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A10(6)	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A10(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A10(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
A10(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
P1(1)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
P1(2)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
P1(3)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
P1(4)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
P1(5)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P1(6)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P1(7)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
p1(8)	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
P1(9)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P1(10)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2(1)	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P2(2)	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2(3)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
P2(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
P2(5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
P2(6)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
P3(1)	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P3(2)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
P3(3)	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
P3(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P3(5)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
P3(6)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
P3(7)	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
P3(8)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P4(1)	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
P4(2)	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
P4(3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4(4)	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
P4(5)	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
P4(6)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P5(1)	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
P5(2)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
P5(3)	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
P5(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P5(5)	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
P5(6)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P5(7)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
P5(8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

0 = ausencia de banda; 1 = presencia de banda

7.5 Glosario.

Identidad genética: Cada persona es singular, diferente de cualquier otra, porque su dotación genética es única.

Distancia genética: es la medida de la diferencia en lo que respecta a las distintas frecuencias alélicas de un número determinado de genes entre individuos o poblaciones determinadas. La distancia genética entre dos poblaciones se calcula hallando la diferencia de las frecuencias génicas de las dos poblaciones.

Diversidad genética: es la variedad de genes entre y dentro de las especies. La diversidad genética dentro de las especies les permite adaptarse para defenderse de nuevas plagas y enfermedades, ajustarse a los cambios en el ambiente, el clima y los métodos agrícolas.

Coeficiente de diferenciación genética: es la proporción de variación entre poblaciones respecto al total: $G_{ST} = D_{ST} / H_T$ donde D_{ST} = diversidad genética y H_T = variabilidad genética total